



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio funcional de los parálogos *ALT1* y *ALT2* de *Saccharomyces cerevisiae* durante el metabolismo respiratorio y fermentativo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

D O C T O R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A :

FLORENCIA TIBERIA AUCÁN GARCÍA CAMPUSANO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/180/09

ASUNTO: Oficio de Jurado

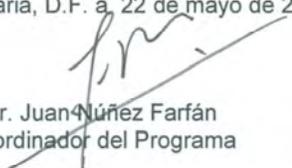
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de marzo de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS del (la) alumno (a) GARCIA CAMPUSANO FLORENCIA TIBERIA AUCAN con número de cuenta 501451242 con la tesis titulada: "Estudio Funcional de los Parálogos ALT1 y ALT2 de *Saccharomyces cerevisiae* durante el Metabolismo Respiratorio y Fermentativo.", realizada bajo la dirección del (la) DRA. MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ:

Presidente:	DR. DIEGO GONZALEZ HALPHEN
Vocal:	DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
Vocal:	DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS
Vocal:	DR. VÍCTOR MANUEL VALDES-LOPEZ
Secretario:	DRA. MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ
Suplente:	DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ
Suplente:	DR. MARIO SOBERON CHAVEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de mayo de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/ipp

Agradezco al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) todo el apoyo brindado durante la realización del doctorado.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Alicia González Manjarrez.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. María Alicia González Manjarrez
Dr. Diego González Halphen
Dr. Mario Soberón Chávez

El jurado de examen quedó constituido por:

Dra. María Alicia González Manjarrez
Dr. Diego González Halphen
Dr. Mario Soberón Chávez
Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dra. Lina Riego Ruiz
Dr. Victor Manuel Valdés López.

A quienes agradezco el cuidado y atención que pusieron en la revisión del presente manuscrito.

La QFB Cristina Aranda brindó importante apoyo técnico durante el desarrollo del presente trabajo.

El Dr. Mario Calcagno del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina (UNAM), brindó importante asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo. Asimismo, el Dr. Martín González Andrade quien brindó importante apoyo técnico para la purificación de la proteína.

El financiamiento para esta investigación provino de:

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN210706-3).
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 49970 Q).
El Convenio 2005-2008 CNR-CONACYT con ITALIA.
El Macroproyecto de Tecnologías de la Información y La Computación, UNAM.

Asimismo, se contó con una beca para estudios de doctorado otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM. Agradezco el apoyo del CONACYT para terminación de esta tesis.

A todos, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Alicia González Manjarrez, por todo el apoyo y las oportunidades brindadas durante el transcurso del doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial el Dr. Diego González Halphen y Dr. Mario Soberón Chávez por sus críticas y comentarios oportunos recibidos durante la realización de este trabajo, así como para la elaboración de la versión final de este manuscrito.

A los miembros de mi jurado el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, el Dr. Luis Felipe Jiménez García, la Dra. Lina Riego Ruiz y el Dr. Víctor Manuel Valdés López, quienes leyeron críticamente este manuscrito e hicieron sugerencias importantes para mejorarlo.

Al Dr. Mario Calcagno por abrirme las puertas de su laboratorio, por su generosidad, apoyo y su contagioso entusiasmo, por los sinceros y sabios consejos.

Al Dr. Martín González Andrade, por su excelente disposición y apoyo técnico para el uso del HPLC y más adelante para modelaje de las ALTs.

A mis compañeros de laboratorio...

A la La QFB Cristina Aranda por toda la ayuda técnica brindada.. por los consejos y las charlas nocturnas...

A Héctor Quezada por su gran disposición y ayuda durante la etapa en la cual se montó el protocolo para la medición de las ALTs, por todas las sugerencias que enriquecieron este manuscrito.

A Hugo Hernández, Maritrini Colón, Guillermo Romero, Geovanni López, Luis Robledo, por las risas, alegrías, discusiones e incluso las angustias compartidas. A Fabiola Hernández su curiosidad y entusiasmo, su alegría de aprender cosas nuevas.

A Jorge Herrera por su gran compañerismo, su inagotable paciencia y generosidad, por todo el apoyo técnico, por las charlas camino a veterinaria y los muchos consejos a los que pocas veces hice caso, pero que me ayudaron a mantener la brújula...

Aprendí mucho de todos ustedes y enriquecieron de muchas y variadas formas mi estancia el 301 oriente.

A Karina Jiménez, mi amiga. Por siempre...siempre estar... Por tu entereza, firmeza, enorme cariño y solidaridad.

A la Dra. Judith Márquez y a la Dra. Margarita Collazo por su cariño, confianza y apoyo en los tiempos difíciles, por abrirme nuevamente las puertas de su laboratorio para brindarme un espacio tranquilo, donde refugiarme para reflexionar y sanar.

A mi familia grande: A las hermanas Campusano y a todo el clan, a Laura Ramón, a mi Marién y a mis Chinitos...por saber como hacerse presentes y acompañarnos siempre, tanto de cerca como de lejos. A Valentina, Ramón y Miguel, alegres padrinos de mi primer manuscrito y de su impresión. A Carolina y Martín, porque en este tiempo descubrí la alegría de tener hermanos.

A mi familia... Cynthia, Federico y Jesús.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la duplicación génica.....	6
Metabolismo del nitrógeno en la levadura.....	9
L-alanina y su papel en la célula.....	13
Metabolismo de la L-alanina.....	15
Las transaminasas de L-alanina.....	18
L-alanina y las ALTs en <i>S. cerevisiae</i> : YLR089c y YDR111c.....	24
Planteamiento del problema.....	33
Objetivos.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
Materiales y Métodos.....	35
Resultados.....	41
Discusión.....	60
Conclusiones.....	76
Perspectivas.....	78
Referencias.....	80
Anexos.....	89

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Reacciones en las que se produce o utiliza L-alanina.	13-15
Tabla 2.	Resumen de las alanina aminotransferasas descritas en la literatura para distintos organismos	19
Tabla 3.	Cepas utilizadas en este trabajo	35
Tabla 4.	Velocidad específica de crecimiento	45
Tabla 5.	Actividad específica de alanino aminotransferasa	48
Tabla 6.	Actividad específica de alanino aminotransferasa en cultivos de YPD	50
Tabla 7.	Pasos de purificación de Alt1p	58
Figura 1.	Esquema general de las cinco vías principales para la biosíntesis y catabolismo de la L-alanina	17
Figura 2.	Esquema general de la reacción catalizada por las alanina aminotransferasas	18
Figura 3.	Alineación de las secuencias de aminoácidos de Alt1p y Alt2p	26
Figura 4.	Modelo del monómero de Alt1p y Alt2p	28
Figura 5.	Velocidad específica de crecimiento de cepas en condiciones fermentativas	43
Figura 6.	Velocidad específica de crecimiento de cepas en condiciones respiratorias	46
Figura 7.	Inmunodetección de Alt1p-TAP y Alt2p-TAP	52
Figura 8.	Northern Blot comparando la expresión de <i>ALT1</i> en glucosa y en etanol	53
Figura 9.	Estimación de la forma multimérica de Alt1p	55
Figura 10.	Estabilización de Alt1p con glicerol	56
Figura 11.	Gel SDS-PAGE de las fases de purificación de Alt1p	57
Figura 12.	Determinación de los valores de K_s y V_{max} por L-alanina y α -KG de Alt1p	58
Figura 13.	Modelo donde se esquematiza la participación de Alt1p y de la glutamina aminotransferasa en el metabolismo de la L-alanina	68

RESUMEN

La redundancia génica es una característica común en los genomas de la mayoría de los seres vivos y se cree que tiene un papel fundamental en su evolución: la duplicación de genes provee el sustrato sobre el cual actúa la mutación y la selección natural para dar lugar a genes con nuevas funciones, interacciones o patrones de expresión. Se ha propuesto que un evento de duplicación ancestral del genoma completo en el linaje de *Saccharomyces* pudo haber facilitado el establecimiento del metabolismo facultativo en estas levaduras. Los ORFs YLR089c y YDR111c (*ALT1* y *ALT2*, respectivamente) son una pareja de genes duplicados que se originaron como resultado de este evento de poliploidización ancestral. Presuntamente codifican para dos alanina aminotransferasas y conservan un 67% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, se desconoce cual es la aportación de cada una de estas enzimas al metabolismo de la L-alanina. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la función de los productos de los genes *ALT1* y *ALT2*, con el fin de analizar si la retención de los mismos constituye una adaptación al metabolismo facultativo.

El análisis del fenotipo de crecimiento de las mutantes en estos genes, en condiciones donde se contrasta el crecimiento fermentativo y el respiratorio, así como su papel en la biosíntesis y catabolismo de L-alanina, permitió definir que Alt1p y Alt2p no son fisiológicamente redundantes. Alt1p es indispensable para la biosíntesis y el catabolismo del aminoácido en condiciones respiratorias. Sin embargo, en condiciones fermentativas su función es principalmente catabólica, por lo que la biosíntesis de L-alanina ocurre por una vía alterna, que no involucra a Alt2p. En presencia de L-alanina, se induce la transcripción de *ALT1*; asimismo, se detecta un mayor actividad enzimática. Alt2p no es capaz de sustituir la función de Alt1p en ninguna de las condiciones estudiadas. No se detectó la expresión de *ALT2*, ni actividad enzimática de la proteína para la cual codifica, ni tuvo la mutación de este gen algún efecto sobre el fenotipo, que evidenciara su posible aportación al metabolismo. *ALT1* y *ALT2* se han subfuncionalizado y mientras la actividad de *ALT1* esta determinada de acuerdo a la fase del metabolismo respiro-fermentativo en que se encuentre la levadura, la participación de *ALT2* se limita probablemente a condiciones fisiológicas muy particulares.

SUMMARY

Genetic redundancy is a common feature of the genomes of most of the organisms that have been sequenced, and it is considered to play a fundamental role in their evolution: duplicated genes provide the substrate upon which mutation and natural selection can act to give rise to genes with new functions, interactions or patterns of expression. It has been proposed that a whole genome duplication event that took place in an ancestor of the *Saccharomyces* lineage could have been instrumental in the establishment of facultative metabolism in these yeasts. The ORF's YLR089c (*ALT1*) and YDR111c (*ALT2*) are a pair of genes that became duplicated as a consequence of this ancient poliploidization event. They code for two putative alanine aminotransferases and conserve a 67% identity; however, little is known about their role in L-alanine metabolism. In this work the study of the *ALT1/ALT2* paralogs was undertaken to analyze whether their retention in the genome represents an adaptation to facultative metabolism.

Analysis of the phenotype of the wild type and mutant strains *alt1* Δ , *alt2* Δ and *alt1,2* Δ , grown in conditions where fermentative and respiratory metabolism, as well as the role of the enzymes in L-alanine synthesis and catabolism are contrasted, showed that Alt1p and Alt2p are not physiologically redundant. The Alt1p isoform plays a central role and is necessary for both the synthesis and catabolism of the aminoacid in respiratory conditions; however, under fermentative conditions it has a mainly catabolic function, while L-alanine biosynthesis occurs through a different route that does not involve Alt2p. In the presence of L-alanine as a nitrogen source, the transcription of *ALT1* is increased, as well as the amount of active enzyme. Alt2p could not substitute the function of Alt1p under any of the tested conditions. Neither the expresión of *ALT2*, nor presence of the protein could be detected, so the *alt2* Δ mutation showed no effect on the phenotype that could give away its role in metabolism. *ALT1* and *ALT2* have undergone subfunctionalization; while the physiological role *ALT1* responds to the yeasts respiratory-fermentative cycle, the expresión of *ALT2* could be limited to very particular physiological conditions.

INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es quizás el organismo eucarionte mejor conocido desde el punto de vista de su biología, no solo por su importancia cultural y económica, sino porque durante décadas ha sido usado como organismo modelo para llevar a cabo estudios bioquímicos, genéticos y moleculares. Actualmente, se conoce la secuencia completa de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996) y sus rutas metabólicas se han caracterizado ampliamente, por lo que *S. cerevisiae* resulta una referencia muy importante para el análisis de otros eucariontes más complejos, incluyendo plantas y animales, ya que comparte con ellos muchas de las características básicas de su organización y funcionamiento celular. Un aspecto fundamental de su fisiología es su metabolismo anaerobio facultativo y la gran eficiencia con la cual fermenta glucosa en etanol vía glucólisis, aun en presencia de oxígeno (efecto Crabtree) haciendo de la levadura el organismo fermentador por excelencia (Frick y Wittmann, 2005).

Si bien la velocidad y eficiencia con la cual la levadura es capaz de obtener energía de la glucosa es clave para que pueda mantener una alta tasa de crecimiento, este organismo muestra una considerable flexibilidad metabólica y fisiológica. Además de glucosa, es capaz de utilizar una variedad de mono y oligosacáridos, así como lactato, acetato, etanol y glicerol como fuentes de carbono (Conant y Wolfe, 2007). También transporta y cataboliza más de 30 metabolitos que utiliza como fuentes de nitrógeno (Godard *et al.*, 2007). La gran eficiencia para fermentar y su capacidad de aprovechar diferentes metabolitos, reflejan la robustez de sus vías metabólicas así como la adaptabilidad genética y fisiológica de la levadura, lo cual tiene implicaciones importantes en lo que respecta a la regulación y coordinación de las actividades de las distintas vías que conforman el metabolismo (Maltsev *et al.*, 2005; Zaman *et al.*, 2008).

Uno de los mecanismos que parece jugar un papel importante en permitir y sostener esta robustez es la duplicación génica. En *S. cerevisiae*, el 44% del total de los genes forma parte de alguna familia multigénica (Dujon *et al.*, 2004), en donde los genes involucrados en alguna de las diferentes vías metabólicas están particularmente favorecidos; el 60% de los

genes del metabolismo central del carbono y el 40% del metabolismo nitrogenado están por duplicado (Marland *et al.*, 2004). Existen evidencias de que cerca de la mitad del total de genes duplicados de la levadura se originaron como consecuencia de un evento de poliploidización en un ancestro del linaje de *Saccharomyces*, ocurrida hace aproximadamente 100 millones de años (Wolfe y Shields, 1997). Debido a que únicamente los hemiascomicetos derivados a partir de este evento presentan un metabolismo facultativo y a que aparentemente el conjunto de los genes conservados no parece ser al azar, se ha propuesto que la duplicación genómica pudo contribuir a mantener un alto flujo glucolítico. Esto permitiría a *S. cerevisiae* la capacidad de consumir glucosa rápidamente a través de la fermentación, crecer más rápidamente y de esta manera competir con organismos que tienen un manejo más eficiente, pero lento, de la glucosa (Wolfe y Shields, 1997; Seioghe y Wolfe, 1999; Piskur, 2001; DeLuna, 2002; Kellis *et al.*, 2004; Conant y Wolfe, 2007).

Alrededor del 13% de los genes duplicados pertenecientes al metabolismo del nitrógeno, se originaron en este evento de poliploidización ancestral (Seioghe y Wolf, 1999). El estudio de dos isoenzimas de glutamato deshidrogenasas anabólicas, *GDH1* y *GDH3* (DeLuna *et al.*, 2001), así como de *LYS20* y *LYS21*, dos homocitrato sintasas que llevan a cabo el primer paso en la vía de biosíntesis de lisina (Quezada *et al.*, 2008), evidenció que la conservación y la especialización de algunos parálogos del metabolismo del nitrógeno también pueden ser una consecuencia de la especialización hacia el metabolismo facultativo. Dado que los genes mencionados anteriormente codifican para enzimas que utilizan sustratos que comparten con el metabolismo central del carbono (como el α -cetoglutarato, piruvato y Acetil-CoA), tienen por tanto, un papel importante en mantener y enlazar estas vías.

Los ORFs YLR089c (*ALT1*) y YDR111c (*ALT2*) constituyen genes parálogos cuya duplicación ocurrió durante el evento de poliploidización ancestral del linaje de *S. cerevisiae* (Wolfe y Shields, 1997). Estos genes codifican para dos presuntas alanina aminotransferasas, las cuales llevan a cabo las reacciones de transaminación entre cuatro importantes intermediarios del metabolismo: L-alanina, α -cetoglutarato, piruvato y glutamato, quedando directamente enlazadas con el metabolismo central del carbono. Por lo tanto, es posible que la retención en duplicado de las alanina aminotransferasas pudiera representar un mecanismo

de adaptación al metabolismo facultativo. A pesar de que para la levadura no se ha descrito la vía que lleva a cabo la biosíntesis de la L-alanina, se ha asumido que su metabolismo ocurre principalmente a través de las alanino aminotransferasas. Sin embargo, a la fecha no se ha caracterizado la función de *ALT1* y *ALT2* y se desconoce cuál es su aportación al metabolismo de la L-alanina. Con el objeto de entender la conservación de esta pareja de genes en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, en este proyecto se estudió el papel fisiológico de *ALT1* y *ALT2* desde dos enfoques principales: (1) el análisis de su participación en la biosíntesis y el catabolismo de la L-alanina contrastando el metabolismo respiratorio y fermentativo; y (2) el análisis de los patrones de expresión de ambos genes.

ANTECEDENTES

Saccharomyces cerevisiae y la duplicación génica

La secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* fue la primera que se obtuvo de un organismo eucarionte (Goffeau *et al.*, 1996). El análisis del genoma muestra que está formado por un total de 12.1 Mb, organizados en 16 cromosomas, donde se encuentran 6607 ORFs (Open Reading Frames por sus siglas en inglés) que codifican secuencias con una longitud mayor a 100 aminoácidos; de éstas, 4809 han sido descritas en al menos una publicación, mientras que 987 aun no se han caracterizado. También se incluye una lista de 811 ORFs que codifican para secuencias que se consideran como dudosas (SGD, a 10 de mayo de 2009). El análisis de la arquitectura del genoma de *S. cerevisiae*, mostró que las regiones codificantes conforman el 70.3% del genoma, que tiene regiones intergénicas pequeñas y que sólo hay intrones en el 4% de los genes, por lo que se considera que el genoma de la levadura es quizás uno de los más compactos (Dujon *et al.*, 2004).

Un aspecto interesante del genoma de *S. cerevisiae* consiste en que el 44.2% está formado por genes duplicados, lo que sugiere que la duplicación génica ha tenido un papel importante en su evolución. Tres tipos principales de duplicación se evidenciaron (Dujon *et al.*, 2004): (1) regiones duplicadas amplias de genes con sintenia conservada (bloques duplicados); (2) familias multigénicas formadas por genes similares, aunque no necesariamente idénticos, con múltiples copias dispersas en el genoma (duplicaciones segmentales); y (3) duplicaciones subteloméricas, las cuales consisten en un mosaico de elementos repetitivos, así como de genes no esenciales involucrados en el metabolismo secundario (Liti y Louis, 2005). De éstas, el primer conjunto de duplicados ha recibido particular atención porque son la evidencia de que en un ancestro de *S. cerevisiae* ocurrió un evento de poliploidización (Wolfe y Shields, 1997; Kellis *et al.*, 2004).

La poliploidización constituye un caso extremo, donde la duplicación incluye al conjunto total de genes de un organismo y se propone que tiene, como ningún otro mecanismo, el potencial de generar cambios rápidos y extensos en el genoma, promoviendo el establecimiento de variaciones en las redes de interacción entre genes o entre las proteínas para las cuales codifican. Estas variaciones pueden alterar de manera muy significativa los patrones de desarrollo, la morfología o la capacidad de aprovechar los

recursos, a través del cual el organismo puede explorar y explotar nuevos nichos (Otto y Whitton, 2000; Carrol, 2001; Freeling y Thomas, 2006). Es muy sugerente que en puntos de divergencia de diferentes linajes, incluyendo a los hemiascomicetos, las angiospermas e incluso de los mamíferos, se encuentran evidencias de eventos de poliploidización (Gu *et al.*, 2002; De Bodt *et al.*, 2005)

De acuerdo con lo anterior, *S. cerevisiae* es un tetraploide degenerado formado por la duplicación de los 8 cromosomas originales y la posterior pérdida del 90% de las copias de los genes, por lo que actualmente sólo se conserva un número de genes ligeramente mayor al de su ancestro no poliploide (Wolfe y Shields, 1997). Dicha conclusión se basó en la comparación del genoma de *S. cerevisiae* con los genomas de *Kluyveromyces lactis* (Wolfe y Shields, 1997) y posteriormente de *Kluyveromyces waltii* (Kellis *et al.*, 2004) y *Ashbya gossypii* (Dietrich *et al.*, 2004). El trabajo en *K. waltii* evidenció la presencia de 145 bloques de genes duplicados a través de los 16 cromosomas, que conservan entre sí el orden y la orientación de los genes que los conforman (457 genes, alrededor del 13% del total de proteínas de la levadura); asimismo, encuentran que por cada centrómero de *K. waltii* hay dos centrómeros homólogos en *S. cerevisiae* (Kellis *et al.*, 2004). Tanto Wolfe y Shields (1997) como Kellis *et al.* (2004) datan este evento de duplicación a 100 millones de años atrás, en un periodo posterior a la separación del grupo de *Saccharomyces* de *Kluyveromyces*. Wolfe y Shields (1997) encuentran que las especies que divergieron antes del evento de poliploidización (especies de *Kluyveromyces*, *Ashbya gossypii* y *Saccharomyces kluyveri*) tienen un metabolismo aerobio estricto, a diferencia de los que divergieron después de él, concretamente las especies de *Saccharomyces sensu stricto* (*S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*), las cuales ya presentan un metabolismo facultativo. Por ello plantean que la duplicación del genoma completo del ancestro de *Saccharomyces* pudo ser el evento que permitió el desarrollo del metabolismo facultativo, en un periodo que además coincide aproximadamente con la apertura de un nuevo nicho que estas levaduras aprovecharon bien: la expansión sobre la tierra de plantas con flores y frutos.

Estudios más recientes donde se compara la capacidad fermentativa, el crecimiento en anaerobiosis, así como la capacidad para generar mutantes *petites*, de 40 especies de levaduras pertenecientes tanto a los linajes de pre y post duplicación genómica, muestran que las especies que pasaron por el evento de poliploidización comparten 3 características (Merico *et al.*, 2007):

- (i) Degradan la glucosa o la fructosa a etanol, aun en la presencia de oxígeno (efecto Crabtree);

- (ii) Crecen en ausencia de oxígeno;
- (iii) Generan mutantes mitocondriales deficientes en respiración (petites).

Las especies que no pasaron por este evento, pueden o no presentar algunas de las características anteriores, pero no comparten todas; y aunque la mayoría son buenas fermentadoras, pocas lo hacen eficientemente en ausencia de oxígeno. Esto indicaría que la levadura “ancestral” probablemente fué un buen fermentador. Sin embargo, una vez que se separaron los linajes a lo largo de la historia evolutiva del clado de *Saccharomyces*, se fueron acumulando cambios genéticos que le permitieron afinar su metabolismo hacia lo que conocemos hoy: una levadura con una alta capacidad para tomar la glucosa del medio, para fermentar y para producir etanol. La duplicación de genes por poliploidización y la pérdida selectiva de una gran parte ellos pudo apoyar este proceso, además de aislar reproductivamente al grupo (Conant y Wolfe, 2007; Merico *et al.*, 2007). Por lo tanto, qué genes se perdieron y cuáles se retuvieron por duplicado pudo ser de gran relevancia para definir el camino que siguió la evolución del metabolismo de *Saccharomyces* y el establecimiento de su forma de vida.

Las causas por las cuales se han conservado estos parálogos en el genoma de *S. cerevisiae* se siguen discutiendo. La teoría indica que después de una duplicación, una de las copias de estas parejas de genes inicialmente redundantes puede silenciarse a través de la acumulación de mutaciones degenerativas (pérdida de función), o ambas copias pueden mantenerse (Lynch y Conery, 2000). El que ambas copias se retengan en el genoma puede responder a que la selección ha favorecido el incremento en los niveles de expresión (efecto de dosis), o a que las copias han divergido funcionalmente, ya sea a través de la neofuncionalización o de la subfuncionalización de sus productos, de sus regiones regulatorias o ambos (Seioghe y Wolfe, 1999; Prince y Pickett, 2002).

Se cree que los genes duplicados proveen estabilidad y robustez a los procesos o rutas metabólicas a los cuales están asociados al incrementar directamente el número de proteínas funcionalmente redundantes (“efecto de dosis”), o actuando como un respaldo en caso de mutaciones deletéreas (Maltsev *et al.*, 2005; Hsiao y Vitkup, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de los parálogos no son redundantes y su permanencia en el genoma reside en el hecho de que han pasado por un proceso mayor o menor de subespecialización, donde como consecuencia de la mutación y las presiones de selección han adquirido nuevas funciones, patrones de expresión o interacciones, que

le permiten a la célula una mayor plasticidad para responder a cambios ambientales (Piskur, 2001; Prince y Pickett, 2002; Ohta, 2003; Kuepfer *et al.*, 2005).

Para el caso particular de *S. cerevisiae*, alrededor del 17% de las parejas parecen haberse mantenido para incrementar la dosis génica ya que se expresan intensamente; lo que sugiere que éste no es el principal mecanismo de selección para la retención de duplicados (Kellis *et al.*, 2004; Kuepfer *et al.*, 2005). Del resto, se plantea que su persistencia en el genoma es consecuencia de la especialización funcional de alguno de ellos, por lo que su retención respondería a que de alguna forma incrementan la eficiencia con la cual se realiza alguna función preexistente. Por ejemplo, su retención podría ser consecuencia de modificaciones sutiles en la estructura de la proteína o de las regiones regulatorias, o debido a que realizan su actividad en compartimentos diferentes, proporcionando con ello alguna ventaja en condiciones de crecimiento particulares, ya que en general los genes de *S. cerevisiae* no son redundantes ni dispensables (Hillenmeyer *et al.*, 2008).

Por otra parte, el análisis de los genes duplicados por categorías funcionales indica que su retención en el genoma no es al azar; destacan, genes de respuesta al estrés, genes de proteínas ribosomales citoplásmicas, así como conjuntos de genes que pudieran relacionarse a la hipótesis de adaptación al metabolismo facultativo ya que codifican enzimas del metabolismo del carbono, particularmente de la utilización anaeróbica de carbohidratos: de transportadores de hexosas, enzimas de la glucólisis, de las pentosas fosfatadas y del metabolismo del piruvato (Seioghe y Wolf, 1999; DeLuna, 2002; Conant y Wolfe, 2007).

Metabolismo del nitrógeno en la levadura

S. cerevisiae como cualquier organismo unicelular, puede percibir la cantidad y la calidad de los nutrientes que se encuentran en su entorno a través de la interacción de diferentes redes de señalización, lo que le permite ajustar su metabolismo, perfil transcripcional y programa de desarrollo para responder de forma rápida y apropiada maximizando de esta manera su sobrevivencia.

La levadura puede utilizar más de 30 compuestos nitrogenados, incluyendo aminoácidos, amonio, urea, bases nitrogenadas y derivados de purinas (Godard *et al.*, 2007). Estos compuestos entran por vía de permeasas (Regenberg *et al.*, 1999) y son utilizados directamente en reacciones biosintéticas o son catabolizados para liberar nitrógeno en forma de NH_4^+ (por desaminación) o glutamato (vía transaminación) (Godard *et al.*, 2007). El NH_4^+ es incorporado al grupo amino del glutamato (fuente del 80% del nitrógeno celular) o a la glutamina por dos vías metabólicas: (i) la aminación reductiva del α -cetoglutarato catalizada por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP codificada por los parálogos *GDH1/GDH3*; (ii) por la síntesis de glutamina dependiente de ATP, a partir de glutamato y NH_4^+ , y la posterior transferencia del grupo amido de la glutamina al α -cetoglutarato, llevada a cabo por la acción concertada entre la glutamina sintetasa (GS) codificada por el gen *GLN1* y la glutamato sintasa (GOGAT) codificada por *GLT1* (Cogoni *et al.*, 1995).

El transporte de nitrógeno, su biosíntesis y catabolismo son procesos altamente regulados, que responden tanto a la calidad como a la cantidad de la fuente de nitrógeno. Dicha regulación está mediada por dos mecanismos generales:

(i) La represión catabólica nitrogenada (*NCR* por sus siglas en inglés), la cuál opera cuando una fuente de nitrógeno preferencial se encuentra disponible para la célula. Consiste en un mecanismo que reduce o evita la expresión de genes de permeasas y enzimas encargadas del catabolismo de compuestos que no son considerados buenas fuentes de nitrógeno. La *NCR*, está mediada por la interacción de 4 factores de transcripción de tipo GATA, los activadores Gln3p y Gat1p/Nil1p y los represores Dal80p y Gzf3,Deh1/Nil2p (Magasanik y Kaiser, 2002); y (ii) el control general de la biosíntesis de aminoácidos (*GAAC* por sus siglas en inglés), el cual percibe la deficiencia de aminoácidos y promueve la expresión de muchos de los genes implicados en su biosíntesis. El *GAAC* se encuentra regulado por el factor de transcripción Gcn4p (Godard *et al.*, 2007).

Cerca del 44% de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno se encuentran por

duplicado (Marland *et al.*, 2004), aunque del total de genes, solo 9 parejas tuvieron su origen en el evento ancestral de poliploidización (Seioghe y Wolf, 1999). Entre estos podemos destacar a *GDH1* y *GDH3* (codifican para glutamato deshidrogenasas), *LEU4* y *LEU9* (codifican para isopropilmalato sintasas), *LYS20* y *LYS21* (codifican para homocitrato sintasas), *BAT1* y *BAT2* (codifican para transaminasas de aminoácidos ramificados), *AAT1* y *AAT2* (codifican para transaminasas de aspartato) y *YDR111c* y *YLR089c* (codifican para presuntas transaminasas de alanina). Este conjunto de genes son particularmente interesantes, ya que codifican para enzimas que catalizan reacciones que utilizan intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo cual su actividad debe estar cuidadosamente acoplada al metabolismo central del carbono y por ello es posible que su retención en duplicado sea una adaptación a las necesidades que impone el metabolismo facultativo.

En condiciones fermentativas, el ciclo de Krebs funciona de manera incompleta y básicamente para la generación de los intermediarios necesarios para el anabolismo. Por su parte, el ATP se obtiene a través de la glucólisis, por lo que el uso de las pozas de piruvato, α -cetoglutarato, así como de Acetil CoA, para la síntesis de aminoácidos no interfiere con la obtención de energía de la célula. Caso contrario ocurre en condiciones respiratorias, donde la obtención de energía recae en el funcionamiento del ciclo de Krebs, por lo que se requiere balancear las necesidades por los sustratos para la síntesis con el mantenimiento de dicho ciclo. En el caso particular de las rutas GDH-NADP y de Lys20p-Lys21p se ha encontrado que su duplicación podría representar un mecanismo a través del cuál la célula modula de manera diferencial el uso de α -cetoglutarato para la síntesis de aminoácidos en condiciones fermentativas y respiratorias (De Luna *et al.*, 2001; Quezada *et al.*, 2008).

Gdh1p/Gdh3p constituyen dos GDH-NADP, encargadas de la asimilación de NH_4^+ a través de la síntesis de glutamato, utilizando α -cetoglutarato, NH_4^+ y NADP^+ como sustratos. Se ha encontrado que aunque catalizan la misma reacción, no son funcionalmente redundantes. Gdh1p tiene una alta capacidad para utilizar el α -cetoglutarato y producir glutamato, por lo que su actividad es importante en

condiciones fermentativas; sin embargo, en condiciones respiratorias su actividad es modulada negativamente por Gdh3p, probablemente a través de la interacción directa entre las proteínas (De Luna *et al.*, 2001). *GDH3* no se expresa en condiciones fermentativas pero su transcripción se induce a medida que se incrementa la función respiratoria (Avenaño *et al.*, 1997); Gdh3p tiene una menor capacidad para utilizar el α -cetoglutarato que Gdh1p, por lo que su actividad en condiciones respiratorias reduce el flujo de esqueletos de carbono a través de las GDH-NADP, a favor del funcionamiento del ciclo de Krebs y la obtención de energía. Aparentemente, la persistencia de la pareja *GDH1/GDH3* en el genoma, permite modular la síntesis de glutamato en relación a las necesidades del metabolismo facultativo. El estudio de la retención de estos parálogos como modelo de subfuncionalización tiene implicaciones interesantes, por una parte, se evidenció que la diversificación en los patrones de expresión de los genes, así como en las propiedades físico-químicas de las proteínas individuales, son importantes para conferirle a la célula una mayor plasticidad fisiológica. Pero además, señala hacia una tercera alternativa, concretamente el potencial de formar proteínas hetero-oligoméricas, donde a través de la interacción de las distintas isoformas se generan proteínas con propiedades diferentes a las homo-oligoméricas (Avenaño *et al.*, 1997; De Luna *et al.*, 2001).

Otro ejemplo relacionado es el de *LYS20/LYS21*, que codifican para dos homocitrato sintasas, encargadas del primer paso en la vía de biosíntesis de la lisina. Dichas enzimas llevan a cabo la condensación de α -cetoglutarato y acetil-CoA para formar homocitrato y CoA. La retención de esta pareja en el genoma de *S. cerevisiae*, también representa un ejemplo de subfuncionalización hacia el metabolismo facultativo. Se encontró que en condiciones fermentativas ambos genes mantienen niveles de expresión similares y las proteínas parecen tener un papel redundante en mantener la poza de lisina, por lo que su presencia en duplicado obedece a una necesidad de incrementar la dosis génica. Sin embargo, las propiedades cinéticas de las enzimas difieren y Lys20p tiene una mayor capacidad para utilizar α -cetoglutarato y generar lisina, por lo que tiene un papel preponderante durante la fermentación; mientras Lys21p, la cual tiene una capacidad menor para sintetizar este aminoácido, se ha especializado

en el metabolismo respiratorio, manteniendo un uso limitado del α -cetoglutarato (Quezada *et al.*, 2008).

***L*-alanina y su papel en la célula.**

La L-alanina es un aminoácido no polar, sin carga y quizás uno de los más abundantes en las proteínas; es un componente importante en la formación y estabilidad de las α -hélices por lo que es abundante en estas estructuras (Voet *et al.*, 2006). En *S. cerevisiae*, la L-alanina es uno de los aminoácidos más abundantes, junto con el glutamato, la glutamina, aspartato y arginina, llegando a alcanzar concentraciones intracelulares de hasta 100 mM (Hans *et al.*, 2001; Hans *et al.*, 2003). Parte de esta producción se destina a la síntesis de proteínas, aunque dependiendo de la condición fisiológica, la L-alanina forma pozas endógenas considerables que se almacenan en la vacuola (75%) y en el citosol (Messenguy *et al.*, 1980). Debido a la facilidad con la cual la L-alanina puede interconvertirse a piruvato por una reacción de desaminación reductiva, además de formar parte de proteínas, tiene un papel fisiológico variado, sirviendo como un metabolito intermediario entre el metabolismo de aminoácidos y el metabolismo central del carbono, particularmente de la glucólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y la gluconeogénesis (Vedavathi *et al.*, 2005). En la Tabla 1 se resumen las reacciones enlistadas en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, enero 2009), que se han descrito para distintos organismos donde interviene la L-alanina, ya sea como producto o sustrato.

Tabla 1. Reacciones donde se produce o utiliza L-alanina. En gris se indican aquellas que se han descrito para *S. cerevisiae*. (*) Se ha identificado actividad enzimática pero no el gen responsable. Fuente: KEGG (enero 2009).

E.C.	Nombre	Proceso	Reacción	Organismos
	alanina deshidrogenasa	Metabolismo de Taurina e hipotaurina; Fijación de carbono	L-alanine + H ₂ O + NAD ⁺ = pyruvate + NH ₃ + NADH + H ⁺ [RN:R00396]	Bacterias
2.6.1.2	Transaminasa de alanina <i>S. cerevisiae</i> : YDR111c (ALT2); YLR089c (ALT1)	Metabolismo de alanina, de glutamato; fijación de carbono	L-alanine + 2-oxoglutarate = pyruvate + L-glutamate [RN:R00258]	Archaea Eukarya (Fungi, Planta, Mammalia)
2.6.1.12	Transaminasa de alanina-oxo-acido	Metabolismo de aspartato y alanina. Puede ser idéntica a 2.6.1.44 (AGX)	L-alanina + a 2-oxo ácido = piruvato + L-amino ácido [RN:R01261]	Bacterias Plantas
2.6.1.44	Transaminasa de alanina-glioxilato <i>S. cerevisiae</i> : YFL030w (AGX1)	Metabolismo de glicina, serina y treonina; de aspartato y alanina	L-alanina + glioxilato = piruvato + glicina [RN:R00369]	Bacterias Eukarya (Fungi, Planta, Mammalia)
2.6.1.30	Transaminasa de Piridoxamina- piruvato	Metabolismo de vitamina B6	piridoxamina + piruvato = piridoxal + L-alanina [RN:R01712]	<i>Pseudomonas sp</i>

Tabla 1 Cont. Reacciones donde se produce o utiliza L-alanina. En gris se indican aquellas que se han descrito para *S. cerevisiae*. (*) Se ha identificado actividad enzimática pero no el gen responsable. Fuente: KEGG (enero 2009).

E.C.	Nombre	Proceso	Reacción	Organismos
2.6.1.43	Transaminasa de aminolevulinato	Metabolismo de Porfirina y clorofila	5-aminolevulinato + piruvato = 4,5-dioxopentanoato + L-alanina [RN:R02271]	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>
2.6.1.51	Transaminasa de serina-piruvato	Metabolismo de Glicina, serina y treonina. Puede ser idéntica a 2.6.1.44 (AGX)	L-serine + piruvato = 3-hidroxi-piruvato + L-alanina	Archaea Bacterias Eukarya (<i>C. elegans</i> , Mammalia, Planta)
2.6.1.71	Transaminasa de lisina-piruvato	Catabolismo de lisina	L-lysine + piruvato = L-2-aminoadipato 6-semialdehído + L-alanina [RN:R00453]	<i>Picchia guilliermondii</i>
3.7.1.3	Kynureninasa <i>S. cerevisiae</i> : BNA5 (YLR231C)	Metabolismo del triptofano	L-kynurenina + H ₂ O = anthranilato + L-alanina [RN:R00987]	Fungi Mammalia
1.5.1.17	alanopina deshidrogenasa		2,2'-iminodipropanoato + NAD ⁺ + H ₂ O = L-alanine + piruvato + NADH + H ⁺ [RN:R00398]	moluscos
2.6.1.37	Transaminasa de 2-aminoethylphosphonato-piruvato	Metabolismo de aminofosfonato	(2-aminoetil)fosfonato + piruvato = 2-fosfonoacetaldehído + L-alanina [RN:R04152]	Bacteria
2.6.1.56	Transaminasa de 1D-1-guanidino-3-amino-1,3-dideoxyscylo-inositol	Metabolismo de estreptomicina	1D-1-guanidino-3-amino-1,3-dideoxyscylo-inositol + piruvato = 1D-1-guanidino-1-deoxi-3-dehidroscylo-inositol + L-alanina [RN:R03502]	Bacteria
2.6.1.77	Transaminasa de Taurina-pyruvate	Primer paso en la degradación aneróbica de taurina	taurina + piruvato = L-alanina + 2-sulfoacetaldehído [RN:R05652]	Bacteria
4.1.1.12	aspartato 4-decarboxilasa	Metabolismo de aspartato	L-aspartate = L-alanina + CO ₂ [RN:R00397]	Bacteria
2.6.1.15	Transaminasa de Glutamina-piruvato (*)	Metabolismo de Glutamina	L-glutamina + piruvato = 2-oxoglutarato + L-alanina [RN:R00576]	Mammalia Fungi
2.6.1.40	Transaminasa de (R)-3-amino-2-methylpropionato-piruvato	Puede ser idéntica a 2.6.1.44 (AGX)	(R)-3-amino-2-metilpropanoato + piruvato = 2-methyl-3-oxopropanoate + L-alanina [RN:R02050]	Bacteria, Eukarya (<i>Drosophila</i> , <i>C. elegans</i> , Mammalia, Planta)
2.6.1.46	Transaminasa de Diaminobutirato-piruvato	Metabolismo de ácido L-alfa gamma-diaminobutírico	L-2,4-diaminobutanoato + piruvato = L-aspartato 4-semialdehído + L-alanina [RN:R02293]	Bacteria
2.6.1.58	Transaminasa de phenylalanine (histidina)	Metabolismo de fenilalanina	L-fenilalanina + piruvato = fenilpiruvato + L-alanina [RN:R00692]	Mammalia
2.8.1.7	Cisteína desulfurasa <i>S. cerevisiae</i> : NFS1 (YCL017c)	Metabolismo de: tiamina y biotina; grupos Fe/S; tionucleósidos en tRNA, movilización de azufre.	L-cisteína + [enzyme]-cisteína = L-alanina + [enzima]-S-sulfanylcisteína	Tres dominios Archaea, Bacteria y Eukaria: (Fungi, Planta, Mammalia)
4.1.1.64	2,2-dialkylglycine decarboxilasa (piruvato)	Metabolismo de alfa-diacil aminoácidos	2,2-dialkylglycine + piruvato = dialkyl cetona + CO ₂ + L-alanina [RN:R03854]	Bacteria
2.6.1.41	Transaminasa de D-metionina-piruvato	Metabolismo de D-alanina	D-metionina + piruvato = 4-methylthio-2-oxobutanoate + L-alanina [RN:R03001]	Planta
2.6.1.66	Transaminasa de valina-piruvato	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina	L-valina + piruvato = 3-methyl-2-oxobutanoato + L-alanina [RN:R01215]	Bacteria, Eukarya (Rhodophyta; Fungi: <i>Debariomyces hansenii</i> ; <i>Picchia stipitis</i> , <i>Candida glabrata</i>)
4.4.1.16	Selenocisteína liase	Metabolismo de seleno aminoácidos	L-selenocisteína + acceptor reducido = selenido + L-alanina + acceptor [RN:R03598]	Bacterias Mammalia
2.3.1.47	8-amino-7-oxononanoate synthase	Metabolismo de biotina	6-carboxyhexanoyl-CoA + L-alanina = 8-amino-7-oxononanoato + CoA + CO ₂ [RN:R03210]	Bacterias Plantas

Tabla 1 Cont. Reacciones donde se produce o utiliza L-alanina. En gris se indican aquellas que se han descrito para *S. cerevisiae*. (*) Se ha identificado actividad enzimática pero no el gen responsable. Fuente: KEGG (enero 2009).

E.C.	Nombre	Proceso	Reacción	Organismos
2.6.1.18	Transaminasa de beta-alanina-piruvato	Metabolismo de propanoato, beta-alanina, aspartato y alanina, de valina, leucina e isoleucina.	L-alanina + 3-oxopropanoato = piruvato + beta-alanina [RN:R00907]	Bacterias Plantas
2.6.1.19	Transaminasa de gamma-aminobutirato	Metabolismo de succinato	4-aminobutanoate + piruvato = succinato semialdehido + L-alanina	Plantas
2.6.1.47	Transaminasa de alanina-oxomalonato		L-alanina + oxomalonato = piruvato + aminomalonato [RN:R02970]	<i>Rattus norvegicus</i>
5.1.1.1	Racemasa de alanina <i>S. cerevisiae</i> : YBL036c	Metabolismo de alanina y aspartato, de D-alanina	L-alanine = D-alanine [RN:R00401]	Todos los dominios
6.1.1.7	tRNA ligasa de alanina <i>S. cerevisiae</i> : YOR335c (ALA1)	Biosíntesis de aminoacyl-tRNAs: metabolismo de aspartato y alanina	ATP + L-alanina + tRNAAla = AMP + difosfato + L-alanyl-tRNAAla [RN:R03038]	Todos los dominios
6.3.2.8	UDP-N-acetilmuramato-L-alanina ligasa	Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato; biosíntesis de peptidoglicanos	ATP + UDP-N-acetilmuramato + L-alanina = ADP + fosfato+ UDP-N-acetilmuramoyl-L alanina [RN:R03193]	Bacterias
3.5.1.28	N-acetilmuramoyl-L-alanina amidase	Biosíntesis de peptidoglicanos	Hidroliza la unión entre residuos de N-acetilmuramoyl-y aminoácidos de ciertos glicopéptidos de pared celular R04112	Bacterias Mammalia

Metabolismo de la L-alanina

La capacidad de biosintetizar L-alanina se ha conservado en los distintos dominios de la vida y se han identificado auxótrofos naturales únicamente entre organismos parásitos o en cercana simbiosis con su hospedero (van der Kaaij *et al.*, 2004; Payne y Loomis, 2006); inclusive entre vertebrados no se le considera un “aminoácido esencial”. Como se puede observar en la Tabla 1, este aminoácido se puede formar como resultado de la actividad de diversas enzimas, en distintas rutas metabólicas; sin embargo, la presencia de estas enzimas así como importancia relativa de cada una de ellas para el aporte de L-alanina como biomasa (para la síntesis de proteína) puede variar entre un grupo de organismos u otro y es particularmente diversa entre las bacterias.

Se han identificado cinco vías principales para sintetizar L-alanina, las cuáles todas consisten de un solo paso (van der Kaaij *et al.*, 2004; Hernández-Montes *et al.*, 2008) (Figura 1): La aminación reductiva del piruvato por parte de la alanina deshidrogenasa (AlaD) (EC:1.4.1.1); la decarboxilación de L-aspartato por la aspartato 4- decarboxilasa (AspD) (EC: 4.1.1.12); la conversión de D-alanina en L-alanina por la racemasa (5.1.1.1); la remoción del S de la cisteína por la cisteína desulfurasa (EC: 2.8.1.7); y a

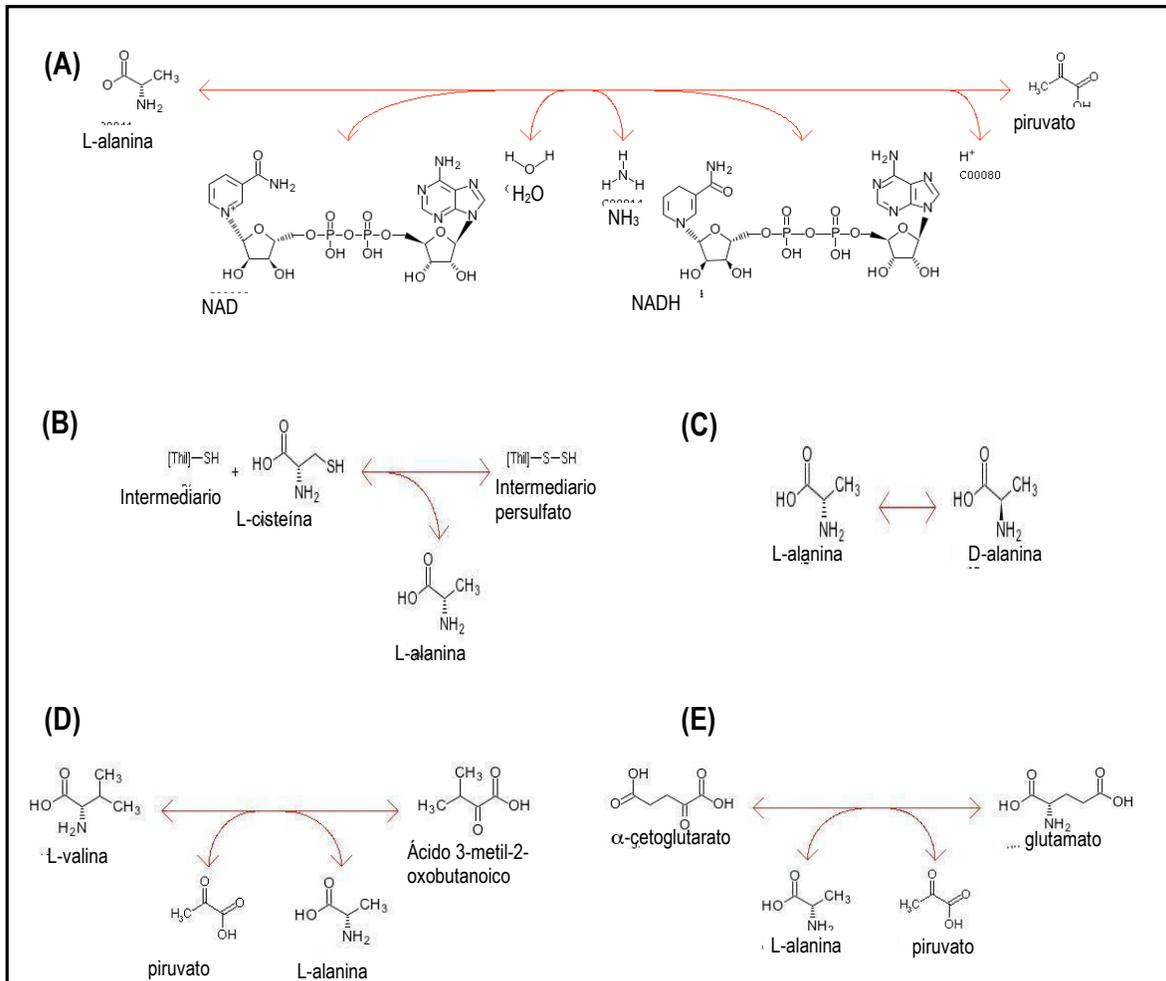
través de reacciones de transaminación de aminoácidos y aminas a piruvato por medio de aminotransferasas, como la transaminasa de alanina-piruvato (ALT) (EC:2.6.1.2), la transaminasa de valina-piruvato (EC: 2.6.1.66) y la transaminasa de GABA (EC:2.6.1.19). Las enzimas AlaD, AspD, la transaminasa de valina-piruvato y la racemasa de alanina se han descrito únicamente para bacterias; las ALT's se encuentran ampliamente distribuidas en eucariontes, aunque pobremente representadas en procariontes (Archeae y Bacteria). La cisteína desulfurasa se distribuye a través de los tres dominios (Hernández-Montes *et al.*, 2008), aunque al parecer en eucariontes su papel fisiológico principal es la de llevar a cabo el metabolismo de proteínas de Fe/S (Mühlenhoff *et al.*, 2004) y la modificación de grupos tiol de tRNAs de la mitocondria (Nakai *et al.*, 2004). La transaminasa de GABA se encuentra en todos los dominios de la vida, sin embargo, su función es distinta en plantas que en organismos como mamíferos, levaduras y *E. coli* en donde cataliza la transaminación entre GABA y α -cetoglutarato para producir succinato semialdehído y L-glutamato; en plantas también puede utilizar al piruvato como aceptor de NH_4^+ , originando succinato semialdehído y L-alanina (Clark *et al.*, 2009).

Una vía alternativa para la biosíntesis de L-alanina es a través de la transaminasa de glutamina (EC:2.6.1.15), la cual constituye el primer paso en la degradación de la glutamina por la ruta de la ω -amidasa. La actividad de esta vía se ha documentado ampliamente para células de mamífero (Cooper y Meister, 1973) y se ha descrito también para el hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Calderon *et al.*, 1985), para la levadura *S. cerevisiae* (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989), así como la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium etli* (Durán y Calderón, 1995).

La ruta de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa funciona como parte de un ciclo que permite obtener glutamato a partir de la glutamina, controlando así la concentración de glutamina en la célula, a la vez que recicla los esqueletos de carbono y el NH_4^+ a través de la producción de aminoácidos, principalmente L-glicina y L-alanina, por medio de una reacción irreversible. El primer paso de este ciclo lo lleva a cabo la transaminasa de glutamina, y consiste en la transaminación del grupo α -amino de la glutamina con un ceto-ácido, formando el aminoácido correspondiente y 2-oxoglutamato. Si el ceto-ácido es glioxilato el aminoácido es glicina, si es piruvato se forma L-alanina. En el segundo paso, el 2-oxoglutamato se hidroliza por la acción de la ω -amidasa para formar NH_4^+ y 2-oxoglutarato; este paso es fisiológicamente irreversible, ya que en ausencia de la ω -amidasa, el 2-oxoglutamato se cicla quedando inutilizable para la célula (Cooper y Meister, 1973). En el tercer paso se forma glutamato por la

acción acoplada de la GDH. El ciclo se completa cuando el glutamato es nuevamente convertido en glutamina por medio de la glutamina sintetasa (GS) (Mora, 1999).

Figura 1. Esquema general de las cinco vías principales para la biosíntesis y catabolismo de la L-alanina. (A) Alanina deshidrogenasa (EC: 1.4.1.1); (B) Cisteína desulfurasa (EC: 2.8.1.7); (C) Racemasa de alanina (EC: 5.1.1.1); (D) Transaminasa de valina-piruvato (EC: 2.6.1.66); (E) Transaminasa de alanina (EC: 2.6.1.2). Fuente: KEGG (enero 2009).



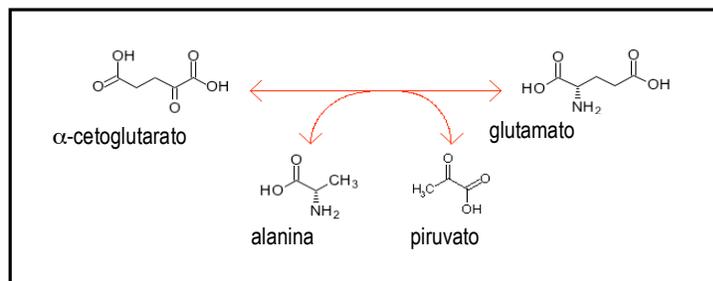
En lo que respecta a la posible ruta de catabolismo de la L-alanina, las opciones son más limitadas; exceptuando la AlaD y la transaminasa de L-alanina, las cuales se les conoce principalmente por su papel en el catabolismo de este aminoácido (Hatch, 1973; McCowen y Phibbs, 1974; DeRosa *et al.*, 1975; Miyashita *et al.*, 2007), el resto de las reacciones que se indican en la Figura 1, no constituyen una vía para la obtención de glutamato o de NH₄⁺ para su asimilación, por lo cual, aunque usen a la L-

alanina como sustrato, no son vías importantes para su catabolismo. Cabe recalcar que en el caso de la levadura no se ha descrito una enzima capaz de realizar la función de la AlaD, por lo que el catabolismo de la L-alanina pudiera recaer completamente en la transaminasa de L-alanina.

Las transaminasas de L-alanina

Las transaminasas de alanina o alanina aminotransferasas (ALT, EC: 2.6.1.2, también conocidas como transaminasas de glutamato- piruvato, o GPT) son enzimas que catalizan la transaminación reversible entre L-alanina y α -cetoglutarato para formar glutamato y piruvato, utilizando al piridoxal 5-fosfato como cofactor (Voet *et al.*, 2006) (Figura 2). Pertenecen a la familia de las transaminasas dependientes de piridoxal clase I.

Figura 2. Esquema general de la reacción catalizada por las alanina aminotransferasas.



El tipo de reacción que catalizan las transaminasas es bifásica; consiste primero en la unión del aminoácido que transfiere el grupo amino al piridoxal fosfato unido a la enzima, produciendo el ceto-ácido correspondiente y la enzima aminada, seguido de la transferencia del grupo amino al cetoácido aceptor (Voet *et al.*, 2006). La actividad de alanina aminotransferasa se ha descrito para especies de los diferentes dominios de la vida, desde *Pyrococcus furiosus*, una archaea hipertermofílica, anaerobia facultativa que requiere de la reducción de S^0 elemental a H_2S ; hasta bacterias, hongos, plantas y animales (Ward *et al.*, 2000; DeRosa y Swick, 1975; Yang *et al.*, 2002; Jadhav *et al.*, 2004; Metón *et al.*, 2004). Las propiedades básicas de algunas de las isoenzimas de ALT que se han caracterizado a la fecha se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las alanina aminotransferasas descritas en la literatura para distintos organismos. α -KG: α -cetoglutarato; M: mitocondria; C: citosol; P: peroxisoma; N.A.: No Aplica; N.D.: No Determinado. SGD: *Saccharomyces Genome Database*.

Organismo	Nombre	Tamaño (aa)	PM del monómero (kD)	Tejidos	Localización Subcelular	Sub-unidades	Km α -KG (mM)	Km alanina (mM)	Referencia
Archea <i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>AlaAT</i>	398	46	N.A.	C	Homodímero	0.9	2.8	Ward <i>et al.</i> , 2000
Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>AlaAT</i>	N.D.	45	N.A.	N.D.	Homodímero	0.054	2.7	Lain-Guelbenzu <i>et al.</i> , 1991
Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ALT1 YLR089c</i>	592	66.42	N.A.	M	Homodímero (por similitud)	N.D.	N.D.	SGD
	<i>ALT2 YDR111c</i>	507	56.77	N.A.	C	Homodímero (por similitud)	N.D.	N.D.	
Rata <i>Rattus norvegicus</i>	<i>ALT1 (AAT1 o GPT1)</i>	496	54.97	Músculo esquelético, corazón, hígado	C	Homodímero	1.1	34	Hopper y Segal, 1962; Lenartowicz y Wojtczak, 1988; Yang <i>et al.</i> , 2009
	<i>ALT2</i>	522	N.D	Hígado, cerebro	M	N.D.	1.6	2.	
Cerdo <i>Sus scrofa domestica</i>	<i>ALT1, (AAT1 o GPT1)</i>	N.D	N.D	Corazón, músculo esquelético	C	Homodímero (por similitud)	0.9	34	DeRosa y Swick, 1975
	<i>ALT2, (AAT2 o GPT2)</i>	N.D	N.D	Riñón, hígado	M	N.D.	0.42	1.9	
Humano <i>Homo sapiens</i>	<i>ALT1 o GPT1</i>	495	54.5	Riñón, hígado, corazón,	C	Homodímero	0.22	21	Gubern <i>et al.</i> , 1999
	<i>ALT2 o GPT2</i>	523	57.9	Músculo, adipositos, riñón y cerebro	M	Homodímero (por similitud)	0.19	5.1	Yang <i>et al.</i> , 2002
	Isoforma Q8TD30-1 Isoforma Q8TD30-2	423	46.82						
Ratón <i>Mus musculus</i>	<i>ALT1</i>	496	55	Hígado, intestino, colon	C	Homodímero (por similitud)	N.D.	N.D.	Jadaho <i>et al.</i> , 2004
	<i>ALT2 o GPT2</i>	522	57.94	Adipositos, músculo, hígado, riñón y cerebro	M	Homodímero (por similitud)	N.D.	N.D.	
Pez <i>Sparus aurata</i>	<i>ALT1</i>	491	54.86	Hígado	C	N.D.	N.D.	N.D.	Metón <i>et al.</i> , 2004
	<i>ALT2</i>	554	61.16	Hígado	N.D	N.D.	N.D.	N.D.	
Planta <i>Atriplex spongiosa</i>	<i>ALA-DEAE-1</i>	N.D.	N.D	N.D.	N.D	N.D	0.3	0.25	Hatch, 1973
	<i>ALA-DEAE-2</i>	N.D	N.D	Células del mesófilo	C	N.D.	0.09	3	
	<i>ALA-DEAE-3</i>	N.D	N.D	Células de la vaina del haz	C	N.D.	0.028	3.1	
Planta <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>GGT1</i>	481	53.3	Hojas, Silicuas verdes, botones florales	P	N.D	0.31	4.76	Liepman y Olsen, 2003
	<i>GGT2</i>	481	53.4	Hojas, raíces	P	N.D	0.51	3.56	
	<i>AtAlaAtc</i>	488	54.17	Hojas	C	N.D	N.D.	N.D.	
	<i>AtAlaAtm</i>	540	59.95	Hojas	M	N.D	N.D.	N.D.	
Planta <i>Medicago truncatula</i>	<i>m-AlaAT</i>	524	57.9	Tejidos adultos y eje embrionario	M	N.D	N.D	N.D	Ricoult <i>et al.</i> , 2006
	<i>c-AlaAT</i>	481	53	Hojas	C	N.D	N.D	N.D	

Aunque las ALT's llevan a cabo la misma reacción de transaminación, su función fisiológica varía considerablemente de un grupo de organismos a otro. En los procariontes que se han estudiado a la fecha se ha descrito una sola forma de ALT; sin embargo, en eucariontes se ha mostrado que pueden existir una o múltiples isoformas y que estas pueden tener diferentes localizaciones subcelulares. Por ejemplo, en la levadura *S. cerevisiae* y en los vertebrados se han identificado una variante mitocondrial y una citosólica (Yang *et al.*, 2002), mientras que en plantas una tercera variante se ha asociado a peroxisomas (Liepman y Olsen, 2003). Esto genera la posibilidad de que las isoformas se subespecialicen en la realización de diferentes funciones, en su distribución en los tejidos y patrones de expresión aun dentro de un mismo organismo (DeRosa y Swick, 1975; Ward *et al.*, 2000; Liepman y Olsen, 2003; Yang *et al.*, 2002; Jadaho *et al.*, 2004; Metón *et al.*, 2004). A continuación se describen algunos de procesos fisiológicos donde se sabe que participan las ALT's .

Papel de las ALT's en el ciclo L-alanina-glucosa

El papel fisiológico mejor conocido de las ALT's consiste en su participación en el establecimiento de ciclos de síntesis y degradación de L-alanina, donde este aminoácido funciona como un acarreador de esqueletos de carbono (C3, en forma de piruvato) y de NH_4^+ entre diferentes tipos celulares, que se reciclan a través de la actividad de las ALT's. En mamíferos, esta serie de reacciones se conoce como el ciclo de la L-alanina-glucosa y permite enlazar el metabolismo de aminoácidos con la gluconeogénesis (Schwartz, 1970; Yang *et al.*, 2002; Vedavathi *et al.*, 2005; Rajamohan *et al.*, 2006).

En músculos u otros tejidos que degradan aminoácidos como una fuente de energía, ya sea durante el ayuno o como consecuencia del exceso de ejercicio (donde operan anaeróticamente), se produce una gran cantidad de amonio por la degradación de proteínas, así como de piruvato por la glucólisis (Yang *et al.*, 2002). Por medio de las transaminación, se colectan los grupos amino del glutamato y las ALT's transfieren el grupo α -amino del glutamato al piruvato formando L-alanina. Una vez formada la L-alanina, se libera al torrente sanguíneo y de esta manera actúa como una molécula

transportadora de amonio (que debe ser desechado en forma de urea), como de piruvato. La L-alanina es tomada por el hígado y a través de la reacción reversa de las ALT's se genera piruvato que es luego utilizado para producir glucosa (gluconeogénesis), el cuál puede ser nuevamente transportado al músculo (Schwartz, 1970; Yang *et al.*, 2002; Vedavathi *et al.*, 2005; Rajamohan *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que las isoenzimas de ALT se han especializado para llevar a cabo la función de síntesis o de catabolismo de la L-alanina en este ciclo (Yang *et al.*, 2002; Jadaho *et al.*, 2004). La variante citosólica (*ALT1*) parece ser la forma predominante en los tejidos donde la glucólisis se lleva a cabo de manera intensa, como en el músculo esquelético y en el cardíaco (DeRosa y Swick, 1975), así como en el riñón, el hígado y el corazón (Gubern *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002; Jadaho *et al.*, 2004) y se ha detectado que puede participar tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de la L-alanina, aunque predomina la primera (Gubern *et al.*, 1999). Por otra parte, en los tejidos gluconeogénicos, como el hígado, el riñón, el cerebro y el tejido adiposo, la ALT mitocondrial (*ALT2*) toma un papel preponderante (observación que se afirma además por el hecho de que en tejidos no gluconeogénicos se encuentra totalmente ausente), por lo que podría estar involucrada en transformar la alanina en piruvato (papel catabólico). Quizás uno de los datos más sorprendentes ha sido la alta expresión, sobretodo de *ALT2* en tejido adiposo, donde además pudiera tener un papel importante en generar piruvato para la gliceroneogénesis (formación de glicerol-3-fosfato, necesario para la síntesis de triacil glicerol, la principal forma de almacenamiento de energía en adipositos), contribuyendo a la homeostasis del metabolismo y almacenamiento de ácidos grasos (Yang *et al.*, 2002).

Otro ejemplo del papel de las ALT's en el reciclamiento del piruvato y NH_4^+ entre tejidos, se ha estudiado en plantas con un tipo de fotosíntesis C4, como *Panicum miliaceum* y *Altriplex spongiosa*. En la fotosíntesis tipo C4, los procesos de asimilación y reducción de CO_2 se separan espacialmente en dos tipos celulares, el mesófilo y la célula de la vaina, respectivamente. Las ALT's se distribuyen en estas células donde llevan a cabo reacciones contrarias: en las células del mesófilo la reacción ocurre en la dirección de la degradación de alanina para la síntesis de piruvato, el cual se utiliza para regenerar fosfoenol

piruvato, sustrato de la carboxilación cuyo producto C4 se utiliza en las células de la vaina. En las células de la vaina, las ALT's producen alanina a partir de productos C3 generados por la decarboxilación del producto C4, para su transporte hacia el mesófilo, permitiéndolo así la regeneración del ciclo. En *Altriplex spongiosa* se identificaron dos isoenzimas denominadas ALA-DEAE -2 y ALA-DEAE-3 que participan en dicha actividad (Hatch, 1973); mientras que de las tres ALTs identificadas para *Panicum miliaceum* solo una, la variante citosólica AlaAT2, se relaciona al metabolismo C4 (Son y Sugiyama, 1992).

El ejemplo mejor documentado acerca del papel fisiológico de las ALTs en plantas se ha relacionado a su participación en la respuesta al estrés por hipoxia. En diversos sistemas, se ha encontrado que cuando disminuye la concentración de oxígeno en las raíces, aumenta notoriamente la concentración de L-alanina, el cual llega a ser uno de los aminoácidos más abundantes en estos tejidos (Good y Crosby, 1989; Liepman y Olsen, 2003; Ricoult *et al.*, 2006; Miyashita *et al.*, 2007). Aunque no se ha definido con certeza cuál es el papel de la L-alanina en estas condiciones, se le ha atribuido diversas funciones que son consecuencia del cambio de metabolismo en las células hipóxicas: almacenar esqueletos de carbono así como NH_4^+ , evitar la excesiva acidificación del entorno celular y ayudar a mantener el estado REDOX.

Durante la hipoxia/anoxia hay un incremento en la glucólisis y en la fermentación, para compensar por la disminución del ATP debida a la inactivación de la fosforilación oxidativa. Esto resulta en la acumulación de acetaldehído, etanol y lactato, los cuales se deben producir para permitir la regeneración de NAD^+ a partir del NADH y así mantener a la glucólisis en funcionamiento. Sin embargo, pueden ser también tóxicos para las células si se acumulan en exceso. Al parecer la producción de alanina vía las ALT's, compite con la piruvato decarboxilasa y la lactato deshidrogenasa por el piruvato, y acumula L-alanina, un metabolito inócuo, en la vacuola. Si bien la producción de alanina no regenera NAD^+ , a menos que la reacción se acople con las GDH, la L-alanina sirve como una reserva rápidamente movilizable tanto de piruvato (el cual se pierde cuando se forma etanol), como de NH_4^+ , ambos necesarios

para restaurar el crecimiento post-hipóxico. Asimismo, al evitar la excesiva acumulación de lactato, permite mantener un control del pH intracelular (Good y Crosby, 1989; Ricoult *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 4 isoenzimas de ALTs: AtAlaAT1 de localización citosólica; AtAlaAT2 de localización mitocondrial; y AtGGT1 y AtGGT2 las cuales se localizan en los peroxisomas (Liepman y Olsen, 2003). AtAlaAT1 y AtAlaAT2 tienen una alta similitud de secuencia con las ALT's descritas para la cebada y el arroz, y al igual que aquellas, participan de manera importante en las respuestas de las plantas a la hipoxia y otros estreses (Miyashita *et al.*, 2007), y se les atribuye de manera generalizada el aumento en la concentración de L-alanina en estas condiciones (Good y Crosby, 1989; Liepman y Olsen, 2003). En la cebada se han identificado dos isoenzimas (llamadas GPTs), que no se han caracterizado molecularmente, una de las cuales se expresa en raíz y hojas, y otra que sólo en las hojas. Durante el estrés por hipoxia, la GPT aumenta notoriamente su expresión en raíz (inducida por anaerobiosis), y se considera que es la principal promotora de la acumulación de L-alanina en estos tejidos (Good y Crosby, 1989). Esto contrasta con lo que se ha reportado en *A. thaliana* donde se demostró a través del uso de mutantes en los genes que codifican para ALTs, que la biosíntesis de L-alanina en condiciones hipóxicas ocurre por una vía alterna y que la mayor inducción de la actividad de dichas enzimas (principalmente de AtAlaAT1) se presenta en el período post-hipóxico, cuando cesa la producción de L-alanina y se hace necesario su catabolismo para la obtención de piruvato (Miyashita *et al.*, 2007). Se propone que parte de la L-alanina que se sintetiza en las raíces de estas plantas como respuesta a la hipoxia es consecuencia de la transaminación entre GABA y piruvato para producir succinato semialdehído vía la transaminasa de GABA en una ruta de síntesis de succinato (Miyashita y Good, 2008)

Mantenimiento del estado REDOX de la célula

Como se mencionó previamente, en algunos organismos y tipos celulares donde se lleva a cabo la fermentación de manera activa y en ausencia de oxígeno, además de producirse ácido láctico, acetato y/o

etanol, se produce L-alanina de forma abundante (Chico *et al.*, 1978; Edwards *et al.*, 1989; Ravot *et al.*, 1996). Aunque esta producción puede ser de gran importancia para el almacenamiento y transporte de esqueletos C3 y NH₄⁺ en la forma de un aminoácido inocuo, se ha descrito que la formación de L-alanina funciona como un mecanismo para reciclar aceptores de electrones involucrados en el catabolismo, como del NADH en retina de abeja (Tsacopoulos *et al.*, 1994), NADPH propuesto para *S. cerevisiae* (Chico *et al.*, 1978) o la Ferredoxin:NADH oxidoreductasa *Pyrococcus furiosus* (Kengen *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 2000). Esto ocurre como consecuencia de acoplar la biosíntesis/catabolismo de L-alanina mediada por las ALT's con la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH), asistiendo así en el mantenimiento del estado REDOX celular que permite que la glucólisis siga llevándose a cabo de manera eficiente. Por este mecanismo se considera que las ALT's se asocian también con el metabolismo del glutamato, ayudando a controlar los niveles de dicho aminoácido a través de su catabolismo.

L-alanina y las ALTs en *S. cerevisiae*: YLR089c y YDR111c

Como la mayoría de los hongos, *S. cerevisiae* es capaz de producir los 20 aminoácidos que requiere para su metabolismo y la L-alanina no es excepción. Además de ser sintetizada por la levadura, puede ser importada a la célula. Se han identificado al menos cinco permeasas capaces de transportar alanina hacia el interior o exterior de la célula: Gap1p, la permeasa general de los aminoácidos; Agp1p una permeasa general de aminoácidos no cargados; Dip5p, la permeasa de aminoácidos carboxílicos; Put4p, la permeasa de prolina y otros aminoácidos neutros; y Tat2p la permeasa de triptofano (Regenberg *et al.*, 1999).

A pesar de que la L-alanina es uno de los aminoácidos más abundantes en *S. cerevisiae*, hasta el momento no se ha descrito la vía que lleva a su biosíntesis, ni si su acumulación en la célula se requiere únicamente para la síntesis de proteínas, o si tiene alguna función adicional. En otra levadura, *Candida maltosa*, el catabolismo de la L-alanina, y por tanto su capacidad de utilizar a este aminoácido como fuente de nitrógeno, se debe principalmente a una alanina aminotransferasa (AlaAT) (Umemura *et al.*,

1994; 1996), al igual que para *Neurospora crassa*, un hongo filamentoso (Kanamori *et al.*, 1982). En *S. cerevisiae* existen varias enzimas que participan en el metabolismo de la L-alanina (Tabla 1); sin embargo, debido a que se ha reportado la actividad de ALT (Chico *et al.*, 1978) y se han encontrado en el genoma dos secuencias que codifican presuntamente para alanina aminotransferasas, YDR111c y YLR089c, se ha asumido que éstas corresponden a la vía principal para la biosíntesis y el catabolismo de este aminoácido (Maaheimo *et al.*, 2001; Frick y Wittmann, 2005; Payne y Loomis, 2006). Pero en general es poco lo que se sabe de ellas ya que no se ha caracterizado de manera sistemática la expresión de los genes ni el papel de las enzimas para las cuales codifican. La mayor parte de lo que se sabe de YDR111c y YLR089c proviene de estudios globales donde se compara la expresión de cientos de genes bajo distintas condiciones. Prácticamente todos estos trabajos usan la colección de mutantes con el fondo genético de la cepa BY4741 (MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) para sus análisis.

YLR089c y YDR111c son una pareja de genes parálogos que pertenecen a los bloques duplicados descritos por Wolfe y Shields (1997), cuyos productos mantienen una identidad entre ellas del 62% en su secuencia de nucleótidos y un 67% en su secuencia de aminoácidos (Figura 3). Por homología, se ha propuesto que estos genes codifican para dos alanina aminotransferasas. Ambas proteínas contienen los sitios que se considera son importantes para la unión del piridoxal 5-fosfato y la L-alanina (Figura 3) (Ward *et al.*, 2000). Tanto el análisis de las secuencias como el modelo de la estructura terciaria muestran que las regiones más conservadas se agrupan en las regiones que constiuyen el sitio catalítico y que une al cofactor (Figura 4). Quizás la diferencia más notoria entre ambos genes es la presencia de una presecuencia en *ALT1* que presuntamente codifica para un péptido señal para la importación de la proteína a la mitocondria, del cual carece *ALT2*. Si bien no se ha determinado experimentalmente qué parte de la presecuencia es responsable de direccionar la proteína hacia este organelo, la localización de *ALT1* se corroboró a través de un análisis realizado del proteoma mitocondrial (Reinders *et al.*, 2006).

miembros del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* (98% de identidad con *S. paradoxus* y 92% con *S. bayanus*), a la vez que se pueden encontrar homólogos de *ALT1* en otras especies de hongos como *Candida glabrata*, *Asbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces waltii* (información complementaria de Wolfe y Shields, 1997).

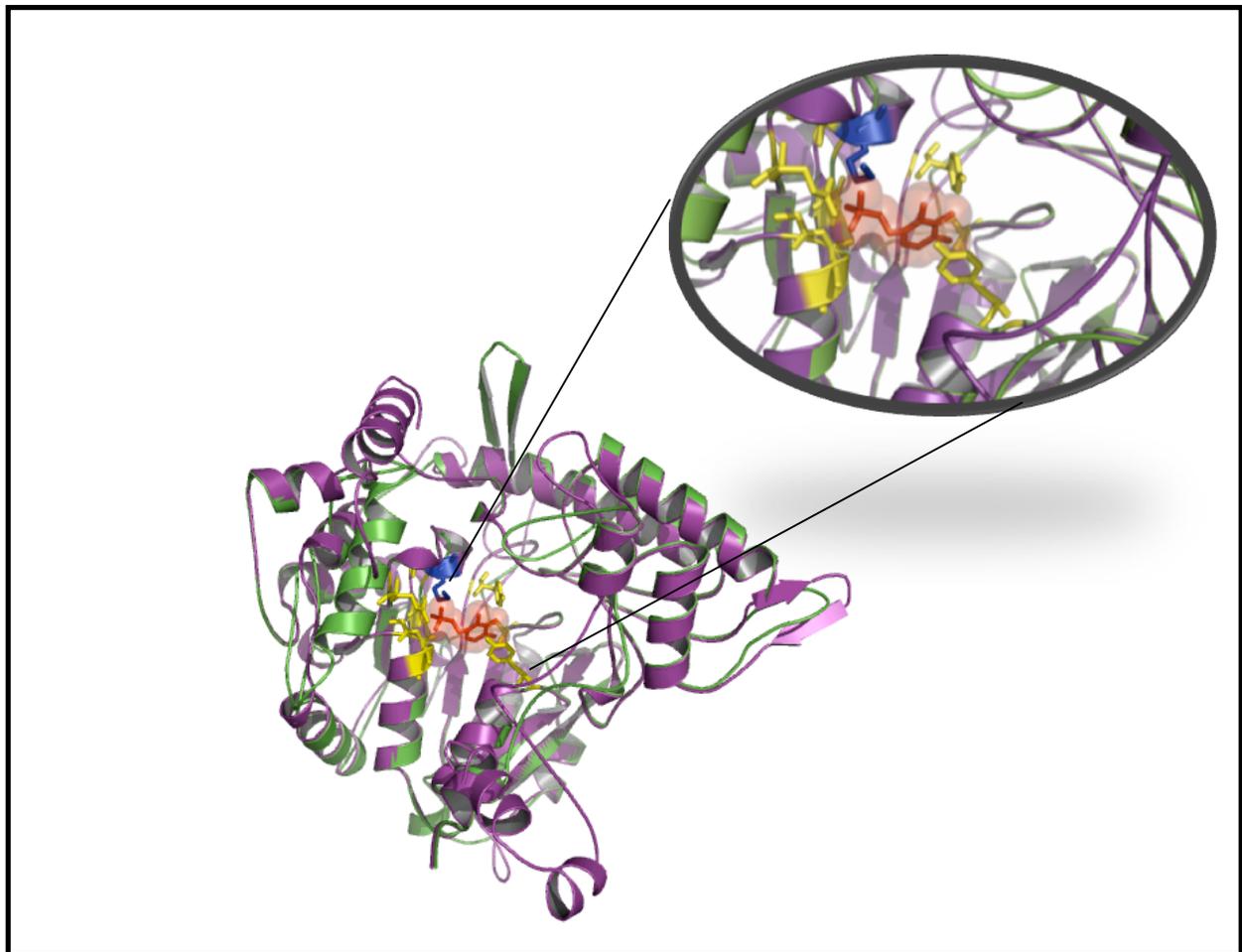
Con respecto a *ALT2*, se encuentran homólogos únicamente dentro del grupo de las *Saccharomyces sensu stricto*; con ellas mantiene un porcentaje de identidad importante (94% de identidad con *S. paradoxus*, 88% con *S. mikatae* y 85% con *S. bayanus*). El que homólogos de *ALT1* se encuentren en especies que se separaron del linaje ancestral antes del evento de poliploidización, podría ser indicativo de que dicho gen y su producto proteico han conservado las características y funciones ancestrales, mientras que *ALT2* ha quedado libre de las presiones de selección para ir acumulando mutaciones que pudieran en principio llevar a la pseudogenización o a la divergencia de sus funciones.

Con la finalidad de explorar la posibilidad de que la selección natural opere o haya operado de manera diferencial en los parálogos, que pudiera dar indicios acerca de su subfuncionalización o neofuncionalización, Anaya-Muñoz (2005) estudió el efecto de la selección natural sobre la historia evolutiva de *ALT1* y *ALT2*, analizando las tasas de sustitución sinónimas y no sinónimas entre estos genes y comparandolos con los ortólogos y parálogos en otros organismos Hemiascomicetes y Ascomicetes. En general encuentra evidencias de selección positiva en el punto que marca la separación de las levaduras Hemiascomicetes del resto de los Ascomicetes, así como en el punto de separación de las levaduras *Saccharomyces sensu stricto* del resto de los Hemiascomicetes, lo que podría coincidir con el período de la duplicación genómica ancestral, indicando que la duplicación del genoma pudo ser un momento en el cual la selección purificadora o evolución neutral se relajaron para dar lugar a eventos de evolución adaptativa.

Para *ALT1* de las levaduras del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* se encontró evidencias

de evolución neutral y no se logró determinar si estas tienen una tendencia hacia la selección positiva o negativa, ya que se señala que el número de secuencias empleadas para dicho análisis fueron muy reducidas. Por su parte, en el caso de *ALT2* encuentra evidencias tanto de selección positiva como de negativa, indicando que si bien existen fenómenos de evolución adaptativa, también se mantiene la conservación de ciertos residuos, los cuales son probablemente importantes para el funcionamiento de la proteína o actividad catalítica (Anaya-Muñoz, 2005).

Figura 4. Modelo del monómero de Alt1p y Alt2p. El modelo de la estructura terciaria de los monómeros se obtuvo por homología utilizando el Swiss-Model Server (Ver. 8.05) (Arnold *et al.*, 2006), empleando como base el cristal de *P. furiosus* (PDB 1xi9A). Alt1p se indica en morado; Alt2p en verde; el piridoxal-5-fosfato se indica como esferas y bastones en rojo. En el recuadro se hace un aumento de la presunta región catalítica. Los aminoácidos conservados importantes para la unión de piridoxal-5-fosfato según el NCBI (mayo del 2009) se indican como bastones en amarillo. En bastones azules se indica el residuo de lisina (K) que forma base de Schiff con el piridoxal 5'-fosfato.



El gen *ALT1*

Fenotipo. La mutante *alt1Δ* en el fondo genético BY4741 es viable bajo cinco condiciones de crecimiento en las cuales fue estudiada: en medio rico (YPD), o en medio mínimo utilizando glucosa, galactosa, glicerol o etanol como fuentes de carbono (Kuepfer *et al.*, 2005); sin embargo, también se ha reportado que la mutante exhibe una disminución en su velocidad de crecimiento (adecuación reducida) después de 15 generaciones en medio mínimo y glucosa (Giaever *et al.*, 2002).

Expresión. Respecto a la regulación transcripcional de *ALT1*, Natarajan *et al.* (2001) encuentran que se regula por Gcn4p, lo cual es consistente con un estudio previo realizado por Gasch *et al.* (2000) donde muestran que *ALT1* aumenta su expresión cuando se suprimen los aminoácidos del cultivo; condición que se conoce induce la traducción del mRNA de Gcn4p. Estas observaciones colocarían a *ALT1* dentro de una vía para la biosíntesis de aminoácidos. Por otro lado, *ALT1* también es inducido por Gln3p, lo que indica que el gen posiblemente esté sujeto a represión catabólica por nitrógeno (NCR) (Scherens *et al.*, 2006). Un aspecto interesante es que al menos en el fondo genético Σ 1278b, *ALT1* incrementa su expresión cuando se utilizan L-alanina, metionina, valina, isoleucina o citrulina como fuentes de nitrógeno, lo que indicaría que la proteína codificada por este gen pudiera estar implicada en el catabolismo de estos aminoácidos (Godard *et al.*, 2007). En el promotor de *ALT1* se encuentran cajas putativas tanto para Gln3p como para Gcn4p, las cuales se encuentran conservadas dentro del grupo de *Saccharomyces sensu stricto*.

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de *ALT1* aumenta cuando las células presentan una disfunción mitocondrial, como por ejemplo en células que carecen de ADN mitocondrial (ρ^0 , petites). En estas condiciones, se afecta la producción de energía vía TCA y fosforilación oxidativa, lo cual no tiene consecuencia mientras las células se encuentran en un medio rico en glucosa. Sin embargo, la capacidad de generar intermediarios biosintéticos (principalmente oxaloacetato y α -cetoglutarato) sí se limita, por lo cual se incrementa la transcripción de genes involucrados en vías

anapleróticas, que permitan restaurar las pozas de estos metabolitos. Al parecer, *ALT1* (así como *BAT2*, la transaminasa de aminoácidos ramificados) pertenece a estas vías anapleróticas, contribuyendo a mantener la poza de piruvato (Epstein *et al.*, 2001). Si bien una parte importante de los genes involucrados en contender con la disfunción mitocondrial presentan regulación retrógrada (RTG), no se ha demostrado que *ALT1* se regule por este mecanismo. Sin embargo, cabe señalar que durante el crecimiento en condiciones fermentativas con una fuente de nitrógeno no preferencial como la L-alanina, la necesidad de generar glutamato a través del catabolismo de otros aminoácidos vía transaminación es de gran relevancia y es un mecanismo generalmente regulado por RTG (Zaman *et al.*, 2008).

ALT1 además de asociarse directamente al metabolismo nitrogenado y al catabolismo de L-alanina (y probablemente de otros aminoácidos), se le ha relacionado también con el metabolismo del fosfato inorgánico, a través de la ruta *PHO*. Se ha demostrado que en la mutante *alt1Δ* se reduce en un 60% la expresión de *PHO5*, el gen que codifica para una fosfatasa ácida que se secreta al espacio extracelular cuando la célula detecta una limitación en el fosfato inorgánico. Asimismo, se logró determinar que la participación de *ALT1* ocurre después de que Pho4, el factor transcripcional responsable de la inducción de *PHO5*, entra al núcleo como respuesta a la deprivación de fosfato. Sin embargo, no se ha aclarado en qué consiste la función de *ALT1*; no se cree que pueda estar involucrado en los pasos de señalización que conducen a la expresión de *PHO5*, sino que suponen que su participación es más bien indirecta (Huang y O'Shea, 2005).

El gen *ALT2*

Fenotipo. La mutante *alt2Δ* en el fondo genético BY4741 es viable cuando la células se crecen tanto en medio rico (YPD), así como en medio mínimo utilizando glucosa, galactosa, glicerol o etanol, como fuentes de carbono (Giaever *et al.*, 2002; Kuepfer *et al.*, 2005). A diferencia de Alt1p que tiene una localización predominantemente mitocondrial, la proteína quimérica Alt2p-GFP se localiza en el núcleo y en el citosol (Huh *et al.*, 2003).

Expresión. No se ha reportado que la expresión de *ALT2* dependa de la actividad de Gcn4p o de Gln3p, a diferencia de lo observado para *ALT1*. En un estudio donde se analiza la expresión de genes en la cepa mutante *gcn4Δ* del fondo genético S288c, crecidas tanto en medio mínimo como en medio rico (YPD), no se obtuvieron resultados concluyentes respecto a la expresión de *ALT2* ya que al parecer no se afecta por la falta de Gcn4p, ni por el uso de 3AT, uno de los principales inductores de la actividad de Gcn4p (Natarajan *et al.*, 2001). El análisis de la expresión en mutantes *gln3Δ* y *gat1Δ* del mismo fondo genético tampoco muestra alteraciones en el patrón de expresión de *ALT2* (Scherens *et al.*, 2006). Es decir, *ALT2* no parece presentar una respuesta clásica de NCR ni al GAAC, lo cual coincide con resultados obtenidos que muestran que cuando los cultivos carecen tanto de nitrógeno como de aminoácidos, *ALT2* disminuye su expresión (Gasch *et al.*, 2000).

Son pocas las condiciones que se han identificado que muestren una clara inducción de *ALT2*, como para poder determinar una condición donde la actividad del gen y su producto proteico sea importante. Entre estas, destaca una inducción de 28 veces cuando las células se sometieron a cultivos prolongados en YPD, de 5 a 20 días en fase estacionaria (fondo genético de la cepa: MATa *ura3-52 GAL2*) (Gasch, *et al.*, 2000). De manera similar, también se ha reportado que *ALT2* modifica su expresión cuando las células se cultivan en medio mínimo pero en ausencia de una fuente de carbono, ya sea glucosa o etanol, donde aumenta su transcripción 50 y 35 veces, respectivamente (cepa diploide FY1679/ Δ HO) (Wu *et al.*, 2004). Estos resultados podrían indicar que *ALT2* se transcribe poco, o se reprime cuando la fuente de carbono es abundante y que se expresa una vez que estas se han agotado, quizás como una respuesta al estrés. Sin embargo, no se ha establecido cuál podría ser su función bajo estas condiciones.

En este sentido resulta interesante el que se encontrara que *ALT2* aumenta su expresión 8 veces durante las fases tardías de la esporulación (Chu *et al.*, 1998). Se sabe que la esporulación se induce en

las células diploides como respuesta a un estrés por nutrientes, particularmente en la fuente de carbono y de nitrógeno, por lo cual las señales que llevan a la inducción del gen en esta condición pudieran ser similares a las expuestas anteriormente donde su expresión se promueve en ausencia de o cuando ya se ha agotado la fuente de carbono, aunque se desconoce de manera específica cuáles son.

En un análisis de microarreglos donde se buscaba identificar los genes implicados en mantener los niveles celulares de poli-fosfato inorgánico, en el fondo genético YKO (basado en la cepa BY4741), la mutación *alt2Δ* disminuye significativamente la acumulación de este metabolito, la cual no se afecta en la cepa *alt1Δ* (Freimoser *et al.*, 2006). Esto sugiere que al igual que *ALT1* (Huang y O'Shea, 2005), *ALT2* también puede tener una función biológica distinta a la predicha, asociada al metabolismo del fosfato, el cual no ha sido entendido.

Otros elementos que pudieran estar implicados en regular la transcripción de *ALT2*, son los remodeladores de cromatina. El incremento en la expresión de *ALT2* se ha detectado en la mutante *snf2Δ*, una subunidad del complejo multiprotéico Swi/Snf, dependiente de ATP, encargado de la remodelación de nucleosomas (Sudarsanam *et al.*, 2000); así como en *sir2Δ* (Meneghini *et al.*, 2003), un remodelador encargado del silenciamiento en regiones teloméricas y subteloméricas, así como del locus MAT. Cabe señalar que el efecto de las mutaciones en *snf2Δ* y *sir2Δ*, tiene el efecto contrario sobre la expresión de *ALT1*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La L-alanina es uno de los aminoácidos más abundantes en la célula y constituye uno de los productos de la fermentación junto con el etanol y el acetato, es poco lo que se sabe acerca de como se lleva a cabo su metabolismo en *S. cerevisiae*. Los genes YDR111c (*ALT2*) y YLR089c (*ALT1*) codifican para dos presuntas alanino aminotransferasas a las cuales se les ha atribuido la función de llevar a cabo la biosíntesis y el catabolismo de la L-alanina. Dichos genes forman parte de los bloques de genes duplicados identificados por Wolfe y Shields (1997) que se originaron en el evento de poliploidización ancestral y que se retuvieron en el genoma de *S. cerevisiae*. Debido a que las alanino aminotransferasas median la interconversión de 4 importantes intermediarios tanto del metabolismo del carbono como del nitrógeno (L-alanina, α -cetoglutarato, piruvato y glutamato), se cree que pueden tener un papel importante enlazando estas vías. La retención de ambos genes en el genoma de *S. cerevisiae* pudiera indicar la necesidad de altas dosis alanino aminotransferasas para la actividad celular; sin embargo, la observación de que *ALT1* y *ALT2* difieren en sus patrones de expresión (Chu *et al.*, 1998; Gasch, *et al.*, 2000; Sudarsanam *et al.*, 2000; Meneghini *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004) y el hecho de que las isoenzimas presentan una localización subcelular distinta (Reinders *et al.*, 2006), señalan más bien a que se han subfuncionalizado. Es posible que dicha subfuncionalización este relacionada al desarrollo del metabolismo facultativo en *S. cerevisiae*, como se ha encontrado para otros genes del metabolismo nitrogenado en la levadura. Sin embargo, es poco lo que se sabe de *ALT1* y *ALT2*, ya que en general ni los genes ni las proteínas han sido caracterizadas, ni se ha confirmado cabalmente su actividad enzimática, por lo que no se ha determinado cual es su aportación al metabolismo de la L-alanina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los parálogos YLR089c (*ALT1*) y YDR111c (*ALT2*) de *Saccharomyces cerevisiae* codifican para dos alanino aminotransferasas funcionales. Asimismo, caracterizar la participación de estas isoenzimas en la biosíntesis y catabolismo de la L-alanina, para evaluar si existe redundancia funcional o subfuncionalización que explique su retención en duplicado en esta levadura.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar la participación de *ALT1* y *ALT2* en el metabolismo de la L-alanina, a través del análisis del fenotipo de crecimiento de las mutantes en dichos genes, en condiciones de cultivo donde se contrasta el crecimiento fermentativo y respiratorio, así como la capacidad para biosintetizar y catabolizar L-alanina.

Estandarizar las condiciones del ensayo enzimático para determinar la actividad de alanino aminotransferasa de las enzimas en las mismas condiciones en las cuales se analizó su fenotipo.

Relacionar los cambios de actividad enzimática con los niveles de expresión de *ALT1* y *ALT2*.

Determinar las propiedades bioquímicas de las proteínas codificadas por YLR089c (*ALT1*) y YDR111c (*ALT2*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

El fondo genético que se utilizó para este trabajo fue una cepa protótrofa para leucina, derivada de la cepa silvestre CLA1 (Quezada *et al.*, 2008), la cual tiene como marcador de selección el alelo *ura3* que le confiere auxotrofia para uracilo. Para los fines de este trabajo, la cepa fue denominada CLA1-2. En la Tabla 3 se presentan los genotipos de las cepas que se utilizaron para este trabajo.

Tabla 3. Cepas utilizadas en este trabajo. *kanMX4*: módulo de interrupción que confiere resistencia al antibiótico geneticina; *natMX*: módulo de interrupción que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina. pRS316: plásmido centromérico (monocopia); pRS426: plásmido 2 μ (multicopia).

Cepa	Genotipo
CLA1-2	<i>MATα ALT1 ALT2 ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-1	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 ALT2 ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-2	<i>MATα ALT1 alt2 Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-D	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 alt2Δ::natMX ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-DC	CLA1-2-D/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-D1C	CLA1-2-D/pRS316 (<i>ALT1</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-D2C	CLA1-2-D/pRS316 (<i>ALT2</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-DM	CLA1-2-D/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-D1M	CLA1-2-D/ pRS426 (<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-D2M	CLA1-2-D/ pRS426 (<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-M	CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
BY4741 (Y00000)	<i>MATα;his3Δ1;leu2Δ0;met15Δ0;ura3Δ0</i>
Y02700 (<i>alt1ΔALT2</i>)	BY4741/ <i>MATα;his3Δ1;leu2Δ0;met15Δ0;ura3Δ0;YLR089c::kanMX4</i>
Y04045 (<i>alt2ΔALT1</i>)	BY4741/ <i>MATα;his3Δ1;leu2Δ0;met15Δ0;ura3Δ0;YDR111c::kanMX4</i>
YDR111c-TAP	BY4741/ ATCC 201388 <i>MATα;his3Δ1;leu2Δ0;met15Δ0;ura3Δ0;YDR111c</i>
YLR089c-TAP	BY4741/ ATCC 201388 <i>MATα;his3Δ1;leu2Δ0;met15Δ0;ura3Δ0;YLR089c</i>

Construcción de mutantes

Para la construcción de la mutante *alt1 Δ* (CLA1-2-1), se transformó la cepa CLA1-2 con un producto de PCR de 2,612 pb que contenía el cassette *kanMX4* flanqueado por secuencias río arriba (756pb) y río abajo (263pb) del gen *ALT1*. Este módulo de interrupción se amplificó a partir de DNA genómico obtenido de la cepa Y02700 de la colección de Euroscarf, utilizando los oligodesoxinucleótidos

ALT1Fo (5'-TCT TGC ACG GTC GCA TCT CTC G-3') y ALT1Re (5'-GAT TAA CGG GTG TTC GAA CTA CGC-3'). Para la construcción de la cepa *alt2Δ* (CLA1-2-2), se transformó la cepa CLA1-2 con un producto de PCR de 2,860 pb que contenía el cassette *kanMX4* flanqueado por secuencias río arriba (1,078pb) y río abajo (186pb) del gen *ALT2*. Este módulo de interrupción se amplificó a partir de DNA genómico obtenido de la cepa Y04045 de la colección de Euroscarf, utilizando los oligodesoxinucleótidos ALT2Fo (5'-GAA ATA GCA CCA CAG AGG CAG G-3') and ALT2Re (5'-ACA ATA GAT GCA GAG GAA TGC TCC-3').

Las transformantes se seleccionaron por su resistencia a Geneticina (G418, 200 mg l⁻¹, Life Technologies). Las mutantes se verificaron por PCR utilizando el oligodesoxinucleótido 5' respectivo de cada gen y el oligodesoxinucleótido 3' Kan3Rev (5'-GGC AGT TCC ATA GGA TGG CA-3'), el cual amplifica la región 5' del gen y un fragmento interno del cassette *kanMX4*, lo que origina un producto de 1924pb para *alt1Δ::kanMX4* y uno de 2244 pb para *alt2Δ::kanMX4*.

La doble mutante *alt1::kanMX4, alt2::natMX* (CLA1-2-D) se construyó de la siguiente manera: el cassette *kanMX4* de la cepa CLA1-2-2 se reemplazó por el cassette *natMX*, el cual le confiere resistencia al antibiótico nourseotricina (Goldstein y McCusker; 1999). El cassette *natMX* utilizado para la transformación se obtuvo a partir de la digestión del plásmido p4339. Las transformantes se seleccionaron con base a su resistencia a nourseotricina (100 mg l⁻¹, clonNAT) y sensibilidad a G418. La inserción se verificó por PCR utilizando los oligodesoxinucleótidos ALT2Fo y Nat1Re (5'-TAA GCC GTG TCG TCA AGA GTG G-3') que amplifican un fragmento de 1,496 pb que incluye 1,078 pb de la región 5' *ALT2* y un fragmento 418 pb del cassette de *natMX*. Esta cepa, CLA1-2-2b (*alt2Δ::natMX*), se transformó con el cassette de interrupción obtenido de la cepa Y02700 como se describió anteriormente, y las transformantes se seleccionaron por la doble resistencia a G418 y nourseothricina. La inserción se verificó por PCR como fue descrito para la cepa CLA1-2-1.

Construcción de los plásmidos monocopia y multicopia que contienen los genes *ALT1* y *ALT2*

Los genes *ALT1* y *ALT2* y su respectiva secuencia promotora 5' se amplificaron y clonaron en el

plásmido monocopia pRS316 (*CEN ARSH4 URA3*) y en el plásmido multicopia pRS426 (2μ ori *URA3*) (Sikorski y Hieter, 1989; Christianson *et al.*, 1992). Para *ALT1* se amplificó un fragmento de 2,798pb utilizando los desoxioligonucleótidos ALT1Fo y ALT1Re, mientras que para *ALT2* se amplificó un fragmento de 2786pb con los desoxioligonucleótidos ALT2Fo y ALT2Re; para ambos casos se utilizó como molde DNA de la cepa BY4741. Los fragmentos amplificados se clonaron en el pGEM-T Easy Vector (Promega) y luego se subclonaron en los plásmidos pRS316 y pRS426 digeridos con NotI (para *ALT1*) o EcoR1 (para *ALT2*), generando los plásmidos pMON1 y pMON2 (*ALT1* y *ALT2 CEN URA3*, respectivamente), así como pMUL1 y pMUL2 (*ALT1* y *ALT2 2 μ URA3*, respectivamente). Estas construcciones se utilizaron para transformar la doble mutante CLA1-2-D, generando las cepas CLA1-2-D1C, CLA1-2-D2C, CLA1-2-D1M y CLA1-2-D2M. Las cepas control CLA1-2-M y CLA1-2-DM se construyeron independientemente transformando la cepa silvestre CLA1-2 y la doble mutante CLA1-2-D con el plásmido pRS426; mientras que la cepa control CLA1-2-DC se obtuvo al transformar la cepa CLA1-2-D con el plásmido pRS316. Todas las transformantes se seleccionaron con base a la prototrofia por uracilo.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en medios mínimos (MM) que contenían sales, elementos traza y vitaminas siguiendo la fórmula de Difco. Como fuente de carbono se utilizó glucosa (2% w/v) o etanol (2% v/v) y como fuente de nitrógeno se adicionó sulfato de amonio (40 mM) o L-alanina (1 g L⁻¹). El medio se suplementó con uracilo (20 mg L⁻¹) cuando era necesario complementar para la auxotrofia de las cepas. Los precultivos se realizaron en medio rico (YPD), excepto cuando se crecían cepas transformadas con los plásmidos centroméricos y multicopia, para los cuales se usó MM. Todos los cultivos de este trabajo se incubaron a 30°C en agitación a 250 rpm.

Obtención de extracto crudo para la determinación de la actividad específica de alanina aminotransferasa

Para la obtención de los extractos crudos se utilizaron cultivos celulares durante la fase exponencial de crecimiento (D.O._{600nm} 0.4-0.6) siguiendo un protocolo modificado al reportado por Cogoni *et al.*,

(1995). Las células se colectaron por centrifugación (3000 rpm, 4°C, 5 min) y se lavaron primero con agua fría y luego con amortiguador de lavado frío (100 mM amortiguador de fosfatos, pH 7.3, 1 mM EDTA). Después de lavar y centrifugar las células, el pellet se resuspendió en amortiguador de extracción (100 mM amortiguador de fosfatos, pH 7.3, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) en un volumen equivalente en mililitros a la mitad del peso de la pastilla en gramos, y se procedió a romper las células con perlas de vidrio (8 ciclos de 1min de vortex y 2 min de hielo). La suspensión se centrifugó (20 min a 14000 rpm a 4°C) para eliminar restos celulares y se rescató el sobrenadante, al cuál se le adicionó piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100 μ M, para ser utilizado como extracto crudo.

Ensayo de actividad específica de alanino aminotransferasa.

El ensayo es una versión modificada al reportado por Segal y Matsuzawa (1970). Se realizó midiendo la tasa de cambio en la absorbancia a 340 nm en una celda de 1 ml de volumen final que contenía: 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 7.3), 400 mM de L-alanina, 24 mM de α -cetoglutarato (α -KG), 40 μ M de piridoxal-5-fosfato, 250 μ M de NADH y 2 U μ l⁻¹ de lactato deshidrogenasa (LDH). La reacción se inició con la adición del extracto crudo (lineal entre 10 y 40 μ g de proteína por ml). Como controles se utilizaron reacciones que no contenían (i) L-alanina, (ii) α -KG, o (iii) LDH, cuyas tasas de cambio en la absorbancia se restaron del valor obtenido para la reacción completa. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Cary 50 (Varian) después de equilibrar la temperatura a 30°C. La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry *et al.*, (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar.

Hibridación tipo western.

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de cepas de la colección BY4741 etiquetadas con TAP (OPEN Biosystems). Se realizó un SDS-PAGE utilizando los extractos de proteínas totales de la cepa silvestre BY4741 y de las cepas YDR111c-TAP (ALT2-TAP) y YLR089c (ALT1-TAP). Se cargaron 50 y 100 μ g de proteína en geles al 10% y luego la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Towbin *et al.*, 1979). La incubación con anticuerpos se realizó de acuerdo a lo

descrito por Towbin *et al.*, (1979). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal Anti-TAP de conejo (CAB1001, OPEN Biosystems) a una dilución de 1:500. Como anticuerpo secundario se utilizó HRP Anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:700.

Purificación de Alt1p

Cultivos de la cepa CLA1-2-D1M, en MM con glucosa y L-alanina como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, se utilizaron para la purificación parcial de Alt1p. Una vez obtenido el extracto crudo de la forma descrita anteriormente, se procedió al fraccionamiento del extracto con sulfato de amonio, donde las proteínas que precipitaron entre el 35 y el 65% de saturación se resuspendieron en amortiguador de fosfatos de potasio (100 mM, pH 7.3) y piridoxal-5'-fosfato (100 μ M). Se equilibró el pH del extracto con amortiguador Bis-Tris-Propano (10 mM, pH 8.5) por ultrafiltración con una columna Amicon Ultra (Millipore). El extracto se filtró a través de membranas Millipore 0.22 μ M y se cargó en una columna de HPLC Sorce 15Q equilibrada con amortiguador Bis-Tris-Propano (10 mM, pH 8.5). La elución se realizó utilizando un gradiente de 0-500 mM de NaCl en el mismo amortiguador, a una velocidad de 1.0 ml min⁻¹. La cantidad de proteína se determinó por el método de ácido bicinconínico (Olson y Markwell, 2007), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar.

Hibridación tipo Northern

El RNA total de levadura se obtuvo por el método descrito por Valenzuela *et al.* (2001), a partir de 100ml de cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento (D.O._{600nm} 0.4-0.6). Se generaron sondas específicas: para *ALT1* se amplificó un fragmento de 1410 pb utilizando los oligodesoxinucleótidos ALT1NthnFo (5'-AGA CCC GTC CTA CAG AGA CAT AGC-3') y ALT1NthnRe (5'-GCG AGC TTC TTG AAC TGC CTT GAA-3'); para *ALT2* se amplificó un fragmento de 1542 pb con los oligonucleótidos ALT2NthnFo (5'-GAC ACA CCA ACA GGA TTT GAA AGG-3') y ALT2NthnRe (5'-CGG GTT CGC TTT CAC AAA GAG CTT-3'). Como control de cargado se utilizó un fragmento de 1599 pb del gen *ACT1* (actina). Las imágenes se analizaron con el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

RESULTADOS

Para evaluar el papel de los genes *ALT1* y *ALT2* en el metabolismo de la L-alanina, se construyeron cepas mutantes sencillas *alt1Δ* y *alt2Δ* y la doble mutante *alt1Δ,alt2Δ*. Para determinar si la retención de ambos genes pudo ser consecuencia de una subespecialización hacia el metabolismo facultativo, se comparó el crecimiento y la actividad específica de alanino aminotransferasa de las mutantes con la cepa silvestre en condiciones fermentativas y respiratorias, utilizando glucosa o etanol como fuente de carbono, respectivamente. Asimismo, se comparó la participación de *ALT1* y *ALT2* en la biosíntesis y el catabolismo de L-alanina, utilizando NH_4^+ o L-alanina como fuentes de nitrógeno.

Con la finalidad de establecer si los cambios observados en el fenotipo de las mutantes sencillas y de la doble se debía exclusivamente a la falta de los genes en cuestión, se analizaron en las mismas condiciones las cepas CLA1-2-D1C y CLA1-2-D2C que contienen a los genes *ALT1* y *ALT2* respectivamente, en el plásmido centromérico pRS316, bajo el control de sus propios promotores. Asimismo, para poder analizar el efecto del aumento en el número de copias de estos genes sobre el fenotipo, se crecieron las cepas CLA1-2-D1M y CLA1-2-D2M que contienen a los genes *ALT1* y *ALT2* respectivamente, en el plásmido multicopia pRS426, también con cada gen bajo el control de su propio promotor. Esto con el fin de aumentar aproximadamente 20 veces en el número de transcritos.

Caracterización fenotípica de la cepa silvestre y las mutantes alt1Δ , alt2Δ y alt1Δ,alt2Δ.

En condiciones fermentativas, la biosíntesis de L-alanina ocurre por una vía alterna que no involucra a las ALTs.

Cuando se crecen la cepa silvestre, las cepas *alt1Δ* y *alt2Δ* y la doble mutante *alt1Δ,alt2Δ*, en MM con glucosa como fuente de carbono y NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, se evalúa la importancia de *ALT1* y *ALT2* para la biosíntesis de L-alanina en condiciones fermentativas. En esta condición, la velocidad específica de crecimiento tanto de las mutantes sencillas como de la doble mutante fue similar a la silvestre (WT), como se

observa en la Figura 5 (en la Tabla 4 se resumen los resultados) . No se observó ningún efecto significativo de los plásmidos sobre la velocidad de crecimiento de las cepas, ya sea en monocopia o en multicopia. Esto muestra que cuando hay abundancia de glucosa y la fermentación se lleva a cabo de manera activa, no se necesita de las ALT's para mantener el crecimiento y la L-alanina requerida para la síntesis proteica se obtiene por otra vía.

ALT1 se requiere para el catabolismo de la L-alanina en condiciones fermentativas.

El crecimiento de las cepas *alt1Δ* y *alt2Δ* y la doble mutante *alt1Δ,alt2Δ* en medio MM con glucosa como fuente de carbono y L-alanina como única fuente de nitrógeno, permite evaluar la importancia relativa de *ALT1* y *ALT2* en el catabolismo de la L-alanina en condiciones fermentativas. En esta condición, tanto las cepas silvestre y *alt2Δ* presentaron una velocidad de crecimiento similar, aunque esta velocidad corresponde a la mitad de lo obtenido para estas mismas cepas durante el crecimiento en glucosa-NH₄⁺. Por otra parte, la falta de *ALT1*, tanto en la mutante sencilla como en la doble, resultó en la inhibición del crecimiento de las cepas, el cual no se recuperó en la cepa transformada con el plásmido multicopia de *ALT2*; es decir, sin la actividad de Alt1p la levadura no es capaz de catabolizar a la L-alanina y por lo tanto no puede utilizarla como fuente de nitrógeno. Esto muestra que *ALT1* y *ALT2* no son funcionalmente redundantes ya que *ALT2* no sustituye a *ALT1*, ni siquiera cuando se encuentra en multicopia (ver Figura 5, Tabla 4). Es posible que la regulación a la cual esta sujeta *ALT2* sea tal, que no permita su expresión en estas condiciones, por lo que el incremento en el número de copias no tenga ningún efecto; o que la proteína haya cambiado de modo que no sea capaz de realizar la función de Alt1p. Por otra parte, cuando se transformó la cepa doble mutante con el plásmido monocopia y multicopia con *ALT1*, se observó una recuperación en la velocidad de crecimiento al nivel de la cepa silvestre, por lo que la falta de crecimiento se puede atribuir completamente a la ausencia de dicho gen: el catabolismo de L-alanina en condiciones fermentativas ocurre exclusivamente a través de Alt1p. La vía alterna que funciona para la biosíntesis de L-alanina cuando las células se crecen en condiciones fermentativas con NH₄⁺, no opera para el catabolismo de este aminoácido.

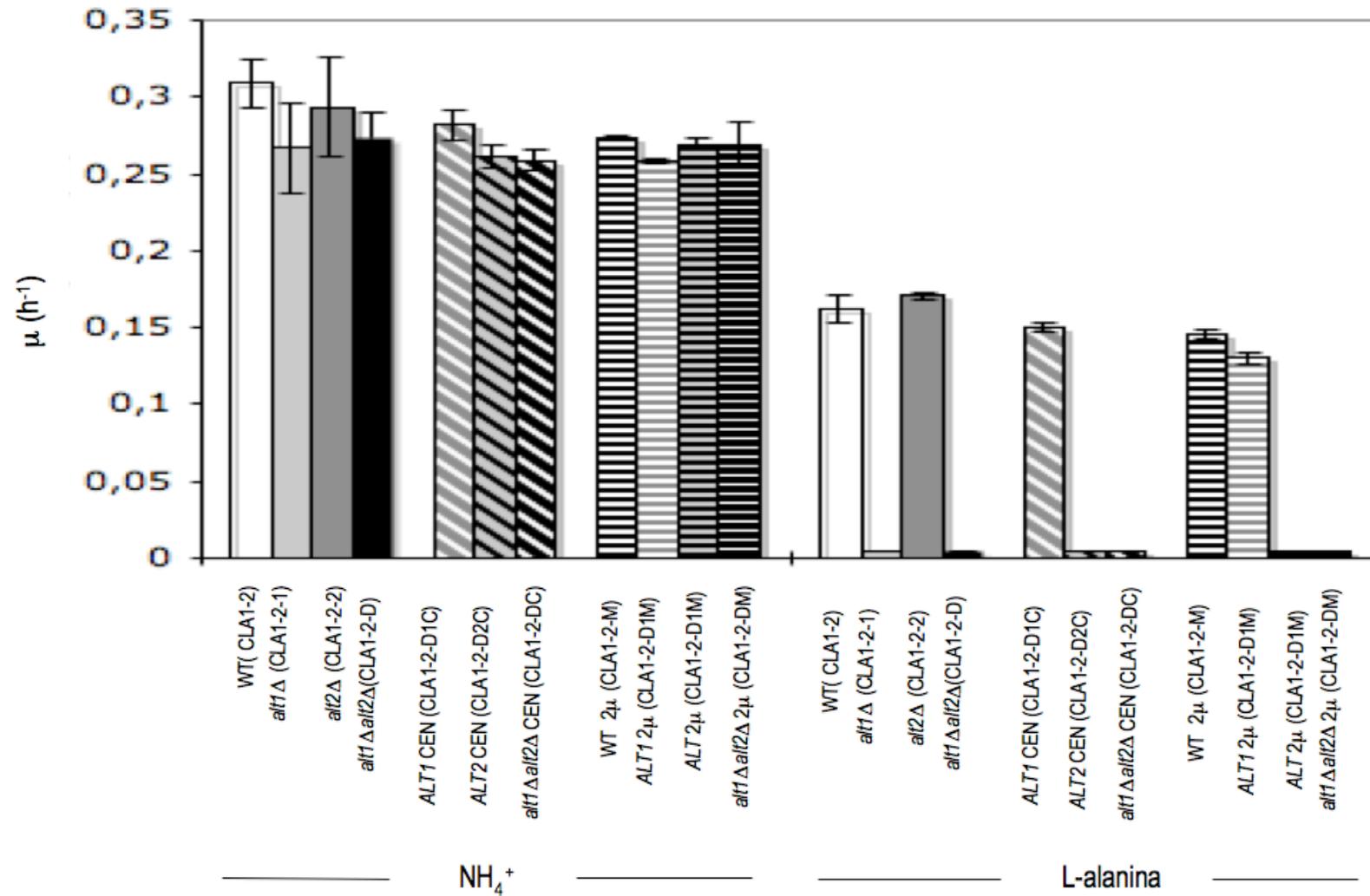


Figura 5. Velocidad específica de crecimiento en condiciones fermentativas (μ). Se compara el crecimiento de la cepa silvestre (WT), las mutantes sencillas *alt1*Δ y *alt2*Δ y la doble mutante *alt1*Δ*alt2*Δ, así como de la doble mutante transformada con los plásmidos monocopia y multicopia que llevan los genes *ALT1* y *ALT2*. Las células se cultivaron en MM con glucosa como fuente de carbono y con la fuente de nitrógeno indicada. La velocidad de crecimiento se determinó durante la fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} 0.2-0.4). Los valores son el promedio de 3 experimentos \pm la desviación estándar.

En condiciones respiratorias ALT1 es indispensable tanto para la biosíntesis como para el catabolismo de la L-alanina

Para evaluar el papel de *ALT1* y *ALT2* en condiciones respiratorias, se crecieron las distintas cepas en MM utilizando etanol como fuente de carbono. Cuando se utilizó NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, se encontró que *ALT1* era indispensable para sostener el crecimiento, ya que ni la *alt1Δ* ni la doble mutante crecieron (Figura 6, Tabla 4). La función sólo pudo ser parcialmente reemplazada por *ALT2*, cuando se usó la cepa de la doble mutante transformada con el plásmido multicopia que contenía el promotor y la región codificante de *ALT2* (cepa CLA1-2-D2M), que aumenta entre 15 y 20 veces el número de copias del gen. En esta situación, la velocidad de crecimiento de la cepa correspondió a una tercera parte de la observada para la cepa silvestre o cualquiera de las cepas que contuviera el gen de *ALT1* intacto, ya sea en mono o multicopia (se indica con una flecha en la Figura 6). Esto indica que *ALT2* es un gen funcional, que codifica para una proteína funcional y que al parecer puede participar en la biosíntesis de L-alanina en condiciones respiratorias. Sin embargo, su efecto se nota únicamente cuando se incrementa el número de copias del gen, por lo que su expresión en esta condición pudiera ser muy limitada. Asimismo, es posible que a nivel de la proteína Alt2p no tenga las propiedades cinéticas ni la localización adecuada para poder sustituir completamente a Alt1p.

Para determinar si la falta del crecimiento de las mutantes *alt1Δ* y *alt1Δ alt2Δ* en etanol- NH_4^+ se debía exclusivamente a la falta de L-alanina como consecuencia de la ausencia de la actividad biosintética de Alt1p, se crecieron las cepas en MM con etanol como fuente de carbono y NH_4^+ y L-alanina (1 g L^{-1}) como fuentes de nitrógeno. Tanto la cepa silvestre como la *alt2Δ* presentaron un crecimiento similar y a diferencia de lo observado en etanol- NH_4^+ , en las cepas *alt1Δ* y *alt1Δ alt2Δ* se observó una recuperación del crecimiento con una velocidad que correspondía al 60% de la cepa silvestre. Las cepas con *ALT1* en plásmido mono y multicopia (CLA1-2-D1C y CLA1-2-D1M, respectivamente) crecieron de manera similar a la cepa silvestre, mientras que las cepas con los plásmidos mono y multicopia de *ALT2* (CLA1-2-D2C y CLA1-2-D2M) crecieron como la doble mutante. Esto muestra que la falta de crecimiento de las cepas *alt1Δ* y *alt1Δ alt2Δ* en etanol- NH_4^+ se debe en parte a que éstas no pueden biosintetizar la L-alanina necesaria, lo cual se recupera al agregar este aminoácido al medio. Por lo tanto, *ALT1* es indispensable para la biosíntesis de L-alanina en

condiciones respiratorias. Sin embargo, el hecho de que la adición de L-alanina no recupere el crecimiento de las mutantes *alt1Δ* y *alt1Δ alt2Δ* al 100%, indica que existe parte de la función de Alt1p que no se realiza en su ausencia y que esta probablemente corresponde a su función en el catabolismo de dicho aminoácido. La función catabólica de Alt1p evidenciada por esta condición pudiera ser particularmente relevante como parte de una vía anaplerótica, requerida para la mantención de las pozas de piruvato.

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento de las cepas sivestre (WT), las mutantes sencillas *alt1Δ* y *alt2Δ* y la doble mutante *alt1Δalt2Δ*, así como de la doble mutante transformada con los plásmidos monocopia y multicopia que llevan los genes *ALT1* y *ALT2*. Las células se cultivaron en MM con glucosa o etanol como fuente de carbono y con la fuente de nitrógeno indicada. La velocidad de crecimiento se determinó durante la fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} 0.2-0.4). Los valores son el promedio de 3 experimentos ± la desviación estándar. (----) indica que la cepa no crece.

Cepa	Glucosa		Etanol		
	NH ₄ ⁺	L-alanina	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ + L-alanina	L-alanina
CLA1-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.31±0.02	0.16±0.008	0.09±0.003	0.09±0.004	0.09±0.001
CLA1-2-M [(CLA1-2)pRS426 (2μ <i>URA3</i>)]	0.27±0.002	0.15±0.003	0.07±0.004	0.09±0.003	0.07±0.001
CLA1-2-1 (<i>alt1Δ ALT2</i>)	0.26±0.028	----	----	0.04±0.003	----
CLA1-2-2 (<i>ALT1 alt2Δ</i>)	0.29±0.032	0.17±0.002	0.09±0.003	0.09±0.005	0.08±0.001
CLA1-2-D (<i>alt1Δ alt2Δ</i>)	0.27±0.017	----	----	0.05±0.002	----
CLA1-2-DC [CLA1-2-D/pRS316 (<i>CENURA3</i>)]	0.26±0.007	----	----	0.05±0.004	----
CLA1-2-D1C [CLA1-2-D (<i>ALT1 CENURA3</i>)]	0.28±0.009	0.15±0.003	0.07±0.005	0.08±0.001	0.08±0.001
CLA1-2-D2C [CLA1-2-D (<i>ALT2 CENURA3</i>)]	0.26±0.007	----	----	0.05±0.001	----
CLA1-2 DM [CLA1-2-D/pRS426 (2μ <i>URA3</i>)]	0.27±0.015	----	----	0.04±0.003	----
CLA1-2-D1M [CLA1-2-D (<i>ALT1</i> 2μ <i>URA3</i>)]	0.26±0.002	0.13±0.004	0.07±0.003	0.08±0.001	0.07±0.002
CLA1-2-D2M [CLA1-2-D (<i>ALT2</i> 2μ <i>URA3</i>)]	0.27±0.003	----	0.02±0.001	0.04±0.002	----

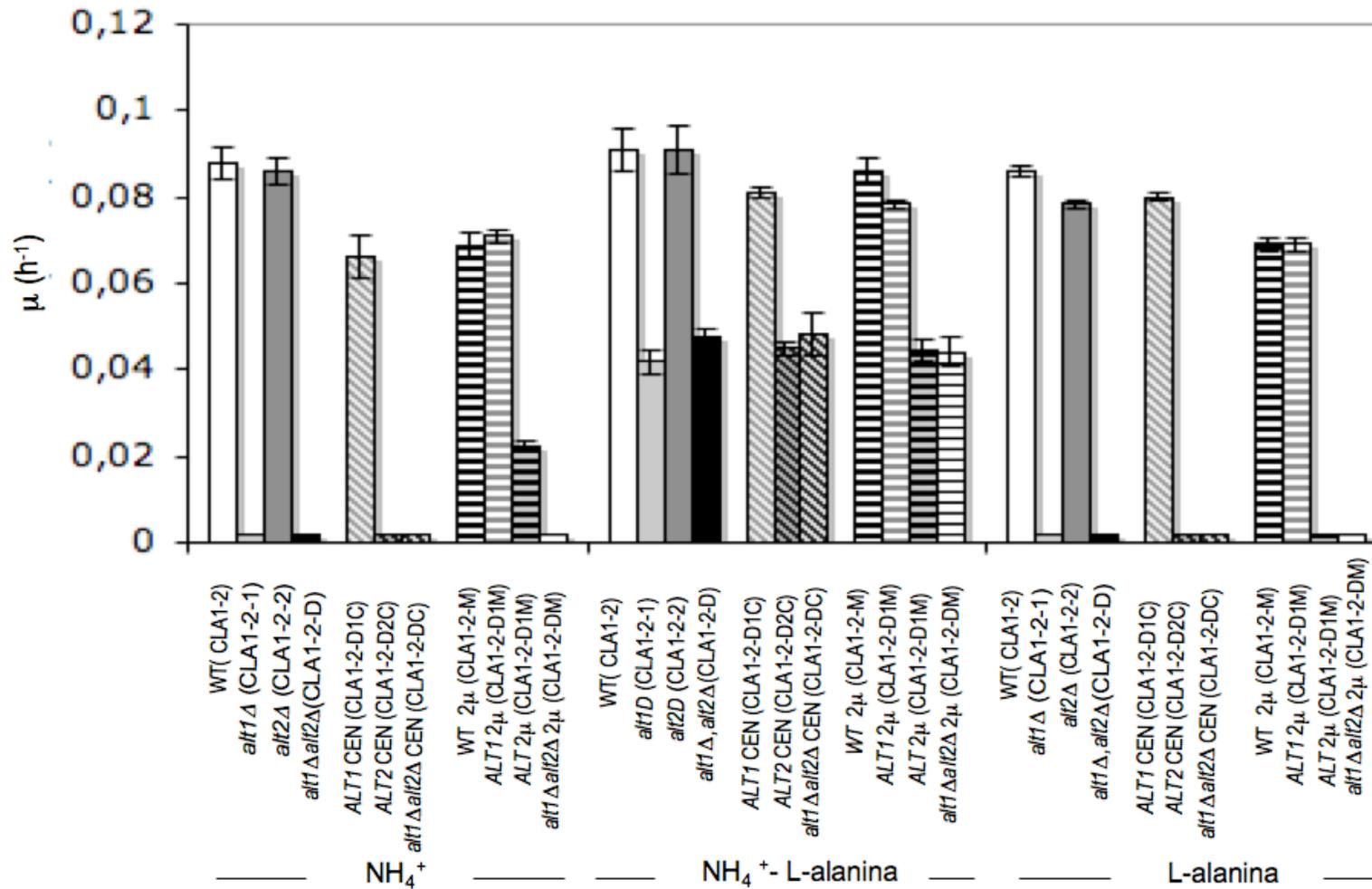


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento en condiciones respiratorias (μ). Se compara el crecimiento de la cepa silvestre (WT), las mutantes sencillas *alt1*Δ y *alt2*Δ y la doble mutante *alt1*Δ*alt2*Δ, así como de la doble mutante transformada con los plásmidos monocopia y multicopia que llevan los genes *ALT1* y *ALT2*. Las células se cultivaron en MM con etanol al 2% como fuente de carbono y con la fuente de nitrógeno indicada. La velocidad de crecimiento se determinó durante la fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} 0.2-0.4). Los valores son el promedio de 3 experimentos \pm la desviación estándar.

Para probar el papel de las ALT's en catabolismo de la L-alanina en condiciones respiratorias, se crecieron las cepas en MM con etanol y L-alanina como única fuente de nitrógeno. Como se observa en la Figura 6, las cepas silvestre, *alt2Δ*, CLA1-2-D1C y CLA1-2-D1M tuvieron un crecimiento similar entre sí; mientras que los cultivos de *alt1Δ*, CLA1-2-D2C y CLA1-2-D2M no crecieron. Esto muestra que en condiciones respiratorias Alt1p es la única enzima capaz de catabolizar la L-alanina para la asimilación de nitrógeno. *ALT2* no puede sustituir el papel de *ALT1*.

Actividad de alanino aminotransferasa en extractos crudos

Como una medida de la cantidad de alanino aminotransferasa activa, se determinó la actividad enzimática específica en extractos crudos, para cada una de las condiciones que se ensayaron en este trabajo. Para el ensayo se utilizó extracto crudo con piridoxal-5-fosfato (a 100 μ m volumen final), para estabilizar a la enzima. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

La L-alanina incrementa la actividad enzimática dependiente de Alt1p.

Debido a que durante el crecimiento en glucosa- NH_4^+ , las mutantes *alt1Δ*, *alt2Δ* y *alt1Δ alt2Δ* presentaron un fenotipo similar a la cepa silvestre (ver Figura 5) y por tanto no eran auxótrofas para L-alanina, se determinó la actividad enzimática específica de alanino aminotransferasa, con el objeto de conocer si en efecto *ALT1* y *ALT2* pudieran tener alguna participación en el crecimiento fermentativo. Se detectó actividad enzimática únicamente en cultivos de la cepa silvestre y la *alt2Δ*, la cual resultó muy similar en ambos casos. Es decir, es probable que toda la actividad detectada corresponda a la actividad de Alt1p. La proteína Alt2p no tiene actividad en esta condición, ni la doble mutante. Cuando se determinó la actividad de las cepas con los plásmidos multicopia de *ALT1* (CLA1-2-D1M) y *ALT2* (CLA1-2-D2M) se detectó un incremento en la actividad de 38 veces para Alt1p, por encima de los 10 a 20 veces esperados. Por otra parte, ni siquiera en multicopia se pudo detectar la actividad de Alt2p, lo cual podría indicar que: (i) *ALT2* no se expresa en esta condición, por lo tanto no hay proteína y la presencia en multicopia no tiene ningún efecto sobre la cantidad de la misma; (ii) existe un mecanismo de regulación postraduccional que regula la presencia de la proteína; o (iii) el ensayo para

determinar actividad enzimática no es el adecuado para Alt2p.

El análisis del fenotipo de las cepas en MM glucosa-L-alanina había indicado la importancia de *ALT1* para el catabolismo de la L-alanina. Debido a que las cepas *alt1Δ*, *alt1Δ alt2Δ* y CLA1-2-D2M no crecen en esta condición, sólo se pudo determinar la actividad enzimática en las cepas silvestre, *alt2Δ* y CLA1-2-D1M. En la cepa silvestre y *alt2Δ*, la actividad detectada fue similar y aumentó aproximadamente 10 veces con respecto a la observada en glucosa-NH₄⁺, lo cual muestra que la L-alanina actúa como un inductor, ya sea de la expresión del gen o de la actividad de la proteína misma. Por otro lado, en la cepa CLA1-2-D1M se observó un incremento de 10 veces en la actividad con respecto a *alt2Δ*, lo cual se encuentra dentro de lo esperado para un plásmido multicopia, y dicho aumento no tuvo un efecto notorio sobre el fenotipo de crecimiento de la cepa comparado con la silvestre.

Tabla 5. Actividad específica de alanino aminotransferasa. Las células se cultivaron en MM con la fuente de carbono y de nitrógeno indicadas. La actividad enzimática se determinó durante la fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} 0.4-0.6) y se expresa como $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$. Los valores son el promedio de 3 experimentos \pm la desviación estándar. (----) indica que la cepa no crece en esa condición.

Cepa	Glucosa		Etanol		
	NH ₄ ⁺	L-alanina	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ + L-alanina	L-alanina
CLA1-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.09±0.03	0.72±0.13	0.072±0.02	0.42±0.09	0.37±0.08
CLA1-2-M [(CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))]	0.08±0.02	0.75±0.06	0.071±0.01	0.36±0.03	0.33±0.03
CLA1-2-1 (<i>alt1Δ ALT2</i>)	0.00	----	----	0.00	----
CLA1-2-2 (<i>ALT1 alt2Δ</i>)	0.07±0.02	0.67±0.04	0.081±0.02	0.44±0.02	0.39±0.04
CLA1-2-D (<i>alt1Δ alt2Δ</i>)	0.00	----	----	0.00	----
CLA1-2-DM [(CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))]	0.00	----	----	0.00	----
CLA1-2-D1M [(CLA1-2-D (<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>))]	3.11±0.62	8.11±0.13	3.27±0.76	8.76±0.83	5.6±0.28
CLA1-2-D2M [(CLA1-2-D (<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>))]	0.00	----	0.00	0.00	----

Aunque en glucosa-NH₄⁺ la determinación de la actividad indica que en esta condición hay enzima activa y que esta pudiera tener un papel en la biosíntesis de la L-alanina, el aumento observado cuando la fuente de nitrógeno es L-alanina concuerda con el papel catabólico atribuido a la enzima. Su función en la biosíntesis es menor o en todo caso es completamente opacado por la vía alternativa.

Los fenotipos de las mutantes crecidas en etanol habían mostrado que Alt1p era indispensable tanto para la biosíntesis como para el catabolismo de la L-alanina y que aquí la vía alternativa no tenía participación. La actividad enzimática que se determinó en las mutantes, en estas condiciones, refuerza esta observación. En etanol-NH₄⁺, únicamente se obtuvo la actividad para las cepas silvestre, *alt2Δ* y CLA1-2-D1M (Tabla 5). Los valores para cada una de las cepas son similares a los obtenidos con glucosa- NH₄⁺, indicando que dicha actividad es suficiente para sostener el crecimiento más lento que se observa en los cultivos en etanol.

En etanol-NH₄⁺, se observó el crecimiento de la cepa CLA1-2-D2M, por lo que Alt2 pudiera tener un papel que se evidenciaría como consecuencia de estar en multicopia. Sin embargo, no se logró detectar actividad enzimática en los cultivos de esta cepa con las condiciones que se establecieron para Alt1p, ni cuando se modificó el pH de la mezcla de reacción para determinar actividades a 5.6, 6.3 y 8.2 (datos no mostrados).

En etanol-NH₄⁺-L-alanina y en etanol-L-alanina la actividad de las cepas silvestre y *alt2Δ* fue similar entre sí, corroborando que Alt1p era la única de las ALT's responsable de la biosíntesis y catabolismo de la L-alanina en condiciones respiratorias. Al igual que lo obtenido para los cultivos en glucosa, el uso de L-alanina como fuente de nitrógeno produjo un incremento en la actividad de Alt1p de 5 veces. La cepa CLA1-2-D1M incrementó la actividad cerca de 35 veces en etanol-NH₄⁺-L-alanina y 15 veces en etanol-L-alanina, y en general los fenotipos de crecimiento no parecieron afectarse, cuando se compararon con la cepa silvestre. La actividad de Alt2p no pudo detectarse cuando se crecieron las cepas *alt1Δ* y CLA1-2-D2M en etanol-NH₄⁺-L-alanina; sin embargo, es necesario recalcar que en esta condición dichas cepas crecieron con la misma velocidad que la doble mutante, lo que indica que Alt2p, pudiera no estar presente o que tiene un papel menor el

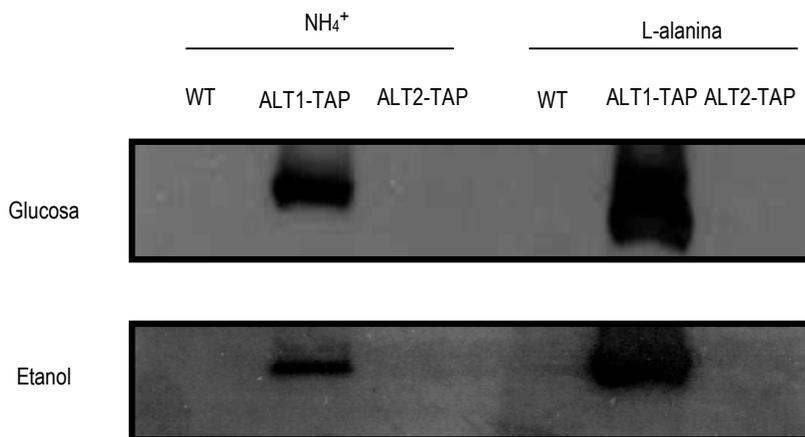
Bajo estas condiciones, se logró detectar la actividad de ALT en la cepa WT en todas las fechas muestreadas. Se observó que durante la fase exponencial tenía un actividad similar a lo encontrado en los cultivos de medio mínimo glucosa-NH₄⁺; sin embargo, dicha actividad aumentó hasta 4 veces durante la fase estacionaria, desde las 24 horas de cultivo a los diez días del mismo. Para los 12 días la actividad disminuyó al a mitad del máximo alcanzado. En la cepa *alt2Δ*, se determinó una actividad muy similar a lo encontrado para la cepa silvestre en todos los tiempos que se analizaron, lo cual muestra que la actividad detectada se debe probablemente a la actividad de Alt1p. No se detectó actividad de la cepa *alt1Δ*, lo cual indicaría que no hay proteína activa de Alt2p en esta condición. Sin embargo también es posible que el protocolo para determinar actividades no fuera el adecuado para medir a Alt2p, pero no se exploraron otras condiciones.

Alt1p es la única isoforma presente durante el metabolismo fermentativo.

Tanto el análisis del fenotipo como el de la actividad enzimática indican una clara participación de Alt1p en la biosíntesis y el catabolismo de la L-alanina durante el metabolismo fermentativo y el respiratorio. Sin embargo, no permitieron identificar la participación de Alt2p en el metabolismo de la L-alanina, ya que su mutación no tiene efecto sobre el fenotipo en las condiciones estudiadas, ni fue posible detectar su actividad con el ensayo enzimático. Para conocer si la falta de actividad de Alt2p se debe a que bajo las condiciones estudiadas no se encuentra presente o si su efecto pudiera enmascarse por la actividad de Alt1p u otras proteínas involucradas en el metabolismo de la L-alanina, o en su defecto, que fuera consecuencia de un artificio del ensayo, se decidió llevar a cabo la inmunodetección de las proteínas por hibridaciones tipo western.

En la Figura 7 se presentan las inmunodetecciones de Alt1p y Alt2p. Debido a que no se contaba con anticuerpos específicos para dicha proteínas, se utilizaron las proteínas etiquetadas con TAP del fondo genético BY4741, pertenecientes a la colección de OPEN Biosystems y un anticuerpo policlonal antiTAP. Se compararon las cepas silvestre BY4741 no etiquetada, ALT1-TAP y ALT2-TAP, crecidas en MM con glucosa-NH₄⁺ y glucosa-L-alanina.

Figura 7. Inmunodetección de Alt1p-TAP y Alt2p-TAP. Las cepas se crecieron en MM con las fuentes de carbono y de nitrógeno indicadas. En cada carril se cargaron 50 μg de proteína total. WT: cepa silvestre del fondo genético BY4741.



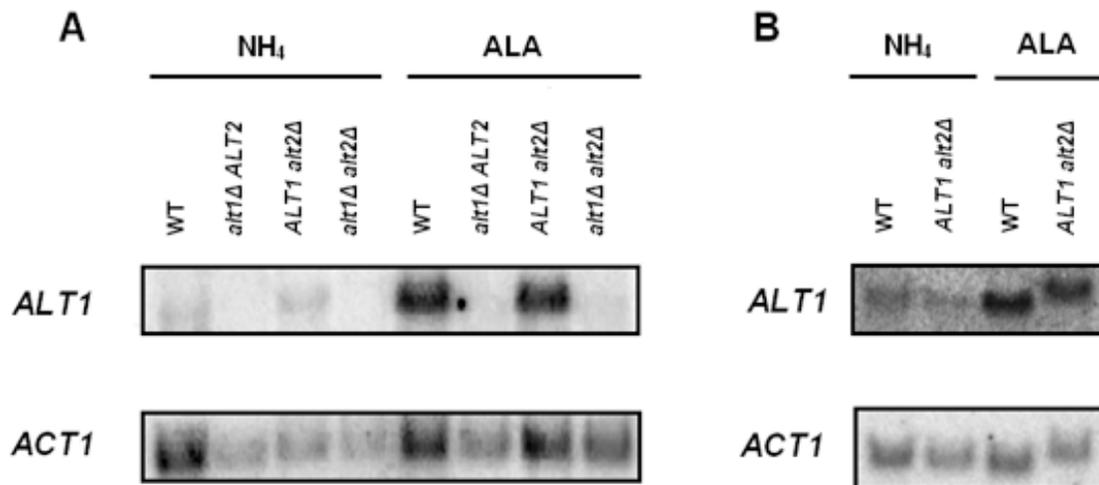
En los carriles con proteína de la cepa silvestre no etiquetada, tal como se esperaba, no se obtuvo señal, indicando que el anticuerpo utilizado reconocía específicamente al epítopo de TAP. Tanto para los cultivos crecidos en glucosa o etanol, con NH₄⁺ o L-alanina como fuente de nitrógeno, se obtuvo señal únicamente para Alt1p-TAP (carriles 2 y 5), mucho más intensa cuando se utiliza L-alanina que NH₄⁺. Esto corresponde con el aumento de actividad observada en glucosa-L-alanina y etanol-L-alanina, lo cual indica que ésta se debe a un aumento en la cantidad de enzima misma, probablemente como resultado de un incremento en la expresión del gen *ALT1*. Por otra parte, no se logró detectar a Alt2p-TAP, lo que parece señalar que esta proteína no se encuentra presente normalmente en estas condiciones de cultivo; posiblemente como consecuencia de una fuerte regulación ya sea a nivel transcripcional o postranscripcional, la cuál limita su presencia a condiciones muy particulares.

Análisis de la expresión de *ALT1* y *ALT2*

El aumento en la actividad de *Alt1p* en presencia de L-alanina como fuente de nitrógeno es consecuencia del aumento en la expresión de *ALT1*. En condiciones fermentativas *ALT2* no se expresa.

Los resultados expuestos anteriormente muestran que *Alt1p* es la única isoforma durante el metabolismo fermentativo y respiratorio y que su concentración aumenta en respuesta a la presencia de L-alanina. En contraste, *Alt2p* no se encuentra presente y por tanto la remoción del gen no tiene un efecto adverso sobre el fenotipo de la levadura en las condiciones ensayadas en este trabajo. Para conocer si la regulación de la cantidad de enzima está determinada a nivel de la expresión de los genes de *ALT1* y *ALT2*, se realizó un análisis de hibridación tipo northern. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Figura 8. Northern Blot comparando la expresión de *ALT1*. Las células se cultivaron en MM glucosa (A) y etanol (B) utilizando la fuente de nitrógeno indicada.



En el panel A de la Figura 8 se comparan los niveles de transcripción de *ALT1* y *ALT2* en las cepas silvestre, *alt1 Δ* , *alt2 Δ* y *alt1 Δ alt2 Δ* , condiciones donde se favorece el metabolismo fermentativo utilizando NH_4^+ y L-alanina como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó la sonda para *ALT1*, tal como se esperaba, se detectó señal únicamente en las cepas silvestre y *alt2 Δ* , lo que indica que la sonda era específica para este gen. Asimismo, mostró que *ALT1* se expresa en glucosa- NH_4^+ y que su expresión se incrementa 7-10 veces en L-alanina, lo cual corresponde con el aumento observado en la actividad enzimática. Por otra parte, no se

detectó señal para *ALT2* en ninguna de las cuatro cepas (no se muestra en la figura), lo que indica primeramente que la sonda empleada era específica para este gen, y permite concluir que *ALT2* no se expresa durante la fase exponencial de crecimiento en condiciones fermentativas, independientemente de la fuente de nitrógeno.

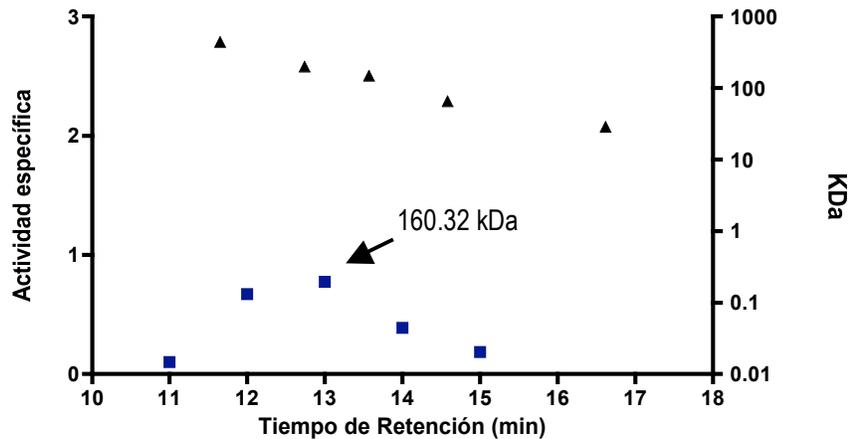
En lo que respecta al crecimiento en etanol (Panel B, Figura 8) se encontró algo similar a lo observado en glucosa: se obtiene expresión de *ALT1* en ambas fuentes de nitrógeno, con una notoria inducción cuando se utiliza L-alanina. Por ello, se puede concluir que independientemente de la fuente de carbono, la L-alanina actúa induciendo la expresión del gen *ALT1* y que el incremento de actividad enzimática obtenida se debe primeramente a un aumento en la cantidad de transcrito, aunque no se puede descartar que la presencia de L-alanina pudiera incrementar la actividad de la propia enzima.

Purificación de Alt1p.

Uno de los objetivos de este trabajo era llevar a cabo la purificación y el análisis de las propiedades cinéticas tanto de Alt1p como de Alt2p; sin embargo, no se logró determinar las condiciones de crecimiento ni del ensayo enzimático que permitieran medir Alt2p. Por este motivo se inició únicamente con la estandarización de un protocolo que permitiera la purificación de Alt1p. Con el fin de obtener una mayor cantidad de la proteína se utilizó la cepa CLA1-2-D1M, la cual se creció en MM glucosa-L-alanina hasta fase exponencial (D.O._{600nm}: 0.4-0.6), la condición donde previamente se había detectado la mayor actividad enzimática.

Estimación de la forma oligomérica de Alt1p. El primer paso consistió en pasar el extracto crudo por una columna de exclusión molecular (Superdex 200) para estimar su forma multimérica. El peso molecular teórico de Alt1p es de 66.4 kDa y de acuerdo al tiempo de retención en la columna (13 minutos=160.32 kDa), es probable que corresponda a un dímero (Figura 9).

Figura 9. Estimación de forma multimerica de Alt1p. (■) Indica el tiempo de retención en el cuál se detectó la actividad de alanino aminotransferasa. La mayor actividad se detecta entre los 12 y 14 minutos, con un máximo a los 13 minutos, lo cual correspondería a un peso estimado de 160.32 kDa. (▲) Estándares SIGMA: anhidrasa carbónica (29kDa); albúmina bovina (66 kDa); alcohol deshidrogenasa (150kDa); β-amilasa (200kDa); Apoferritina (443 kDa).



Estabilidad de Alt1p. La fracción de proteína activa que eluyó de la columna de exclusión molecular se utilizó para probar la estabilidad de la enzima. Para ello, se midió la actividad enzimática de la fracción activa en distintos tiempos, sola o con 15, 30 y 50% de glicerol, donde las muestras se mantuvieron en hielo durante las primeras 12 horas, y luego congeladas a -20° (Figura 10). Se encontró que en general Alt1p es estable durante las primeras 5 horas después de eluir de la columna; sin embargo, tanto en ausencia de glicerol como en glicerol al 15% se redujo de manera importante su actividad a las 12 horas (30 y 25%, respectivamente) y se perdió en su totalidad para las 48 horas. El uso de glicerol al 30% aseguró la estabilidad de la enzima durante 24 horas; sin embargo, ésta se fue perdiendo paulatinamente, hasta quedar en un 36% de la actividad inicial a las 144 horas. Únicamente el uso de glicerol al 50% mantuvo a la enzima con una estabilidad mayor al 90% durante todo el tiempo ensayado. Este ensayo indicó las condiciones que requiere el almacenamiento del extracto.

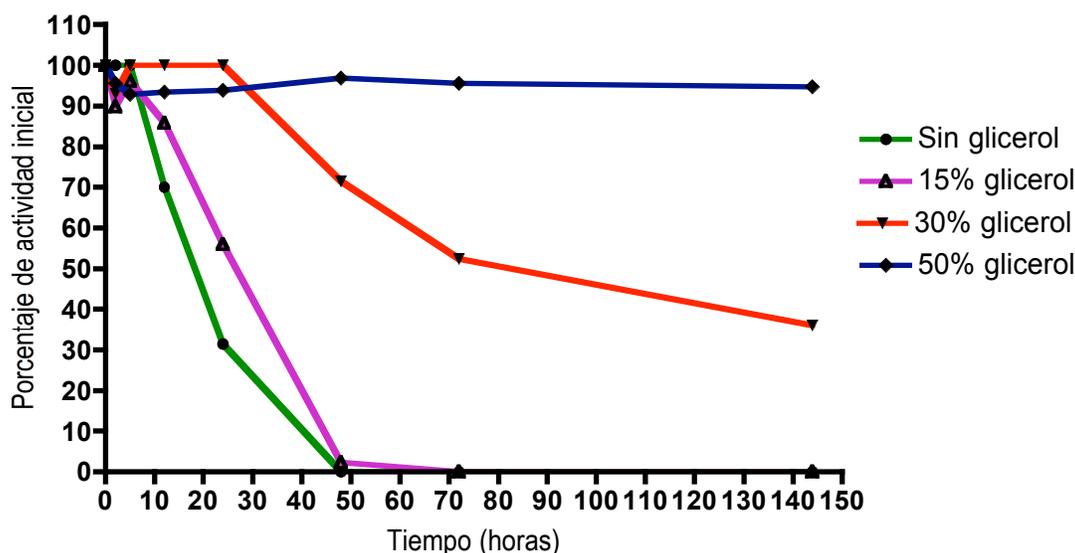
Procedimiento para la purificación de Alt1p.

Consistió en tres etapas:

- (i) La obtención del extracto crudo a partir de un cultivo, a través del mismo protocolo empleado para la determinación de actividades;

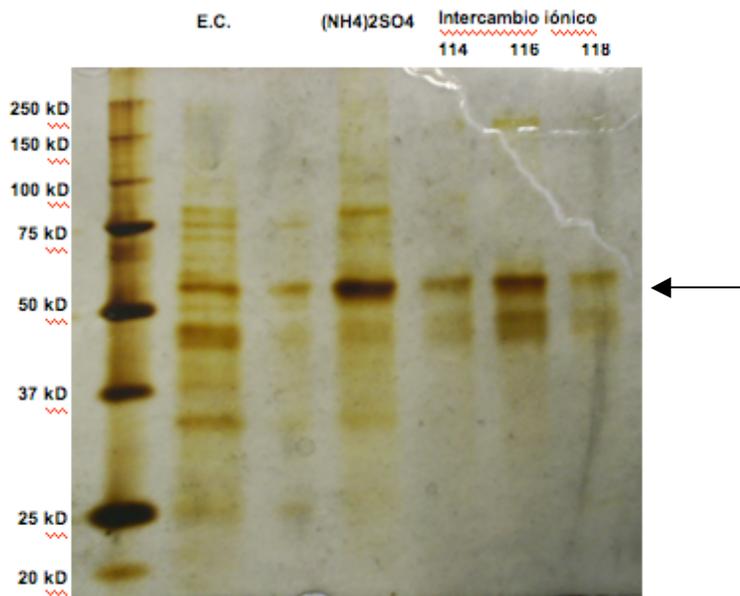
- (ii) Precipitación en sulfato de amonio (35-70%); y
- (iii) Cromatografía de intercambio aniónico (pH 8.5) utilizando un amortiguador de Bis-Tris-Propano (10 mM) como fase móvil y NaCl (500 mM) para eluir; la fracción con mayor actividad eluyó en un solo pico a una concentración de ~366 mM de NaCl.

Figura 10. Estabilización de Alt1p con glicerol. Se utilizó extracto crudo de la cepa CLA1-2-D1M cultivada en MM glucosa-L-alanina, el cual fue inyectado en una columna de separación por exclusión molecular empacada con Sephadex 200, mediante HPLC. La fase móvil fue amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.3. Se le adicionó piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100 μ M a la fracción con mayor actividad de alanino aminotransferasa. Dicha fracción se separó en 4 alícuotas: ● sin glicerol; \triangle 15% de glicerol; \blacktriangledown 30% de glicerol; \blacklozenge 50% de glicerol. Las muestras se mantuvieron en hielo durante las primeras 12 horas, luego a -20°C. Se determinó la actividad enzimática a las 0, 2, 5, 12, 24, 48, 72 y 144 horas después de haber eluido el extracto.



La Tabla 7 muestra los resultados de los pasos de purificación y la Figura 11 muestra una electroforesis en gel SDS-PAGE de las fracciones con mayor actividad de los distintos pasos de purificación. En el gel se observa que después del paso por la columna de intercambio aniónico, aunque no se logró obtener la purificación de la proteína a homogeneidad; en la fracción 116, que presenta la mayor actividad, se logró favorecer la presencia de una proteína con un peso entre 50 y 75 kDa (~60 kDa) que corresponde aproximadamente con el peso esperado de Alt1p. El factor de purificación fue de 53.6, lo que indica que el extracto se limpió de manera importante de las proteínas contaminantes, las cuales de hecho no ejercieron efecto alguno sobre la determinación de actividad enzimática.

Figura 11. Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata con muestras de los extractos procedentes de los diferentes pasos de purificación. Se cargaron 2 μg de proteína en cada carril. La flecha indica una banda que presenta el peso aproximado de la Alt1p (~60 kDa). E.C.: Extracto Crudo. Los carriles 114, 116 y 118 corresponden a las tres fracciones con mayor actividad obtenidas de la columna de intercambio iónico.

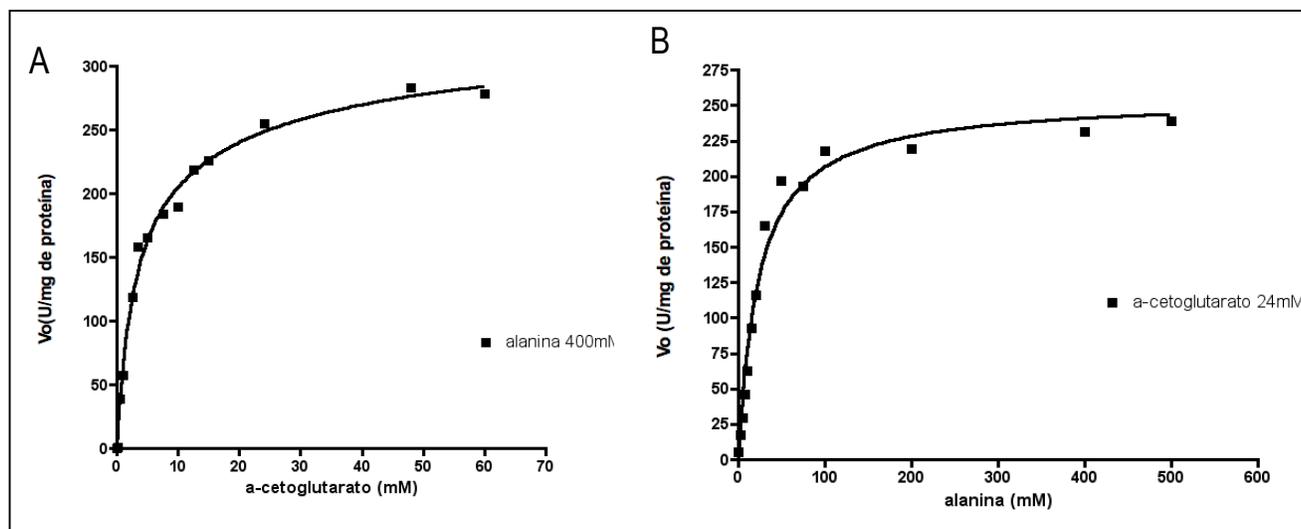


Con el extracto obtenido a partir de la cromatografía de intercambio iónico no se pudo realizar un siguiente paso de purificación (cromatografía de exclusión molecular), ya que al intentarlo la proteína perdió actividad, probablemente debido a que se diluyó demasiado en su paso a través de la columna. Para poder continuar sería importante concentrarla más e inclusive adicionar piridoxal 5-fosfato a la fase móvil para favorecer su estabilidad y así incrementar el rendimiento. La fracción del extracto que se obtuvo de la columna de intercambio iónico se mezcló con glicerol al 50% (adicionado con piridoxal-5-fosfato concentración final $100\mu\text{M}$) para su almacenamiento. En esta condición Alt1p se mantuvo estable durante 2 semanas, tiempo después del cual perdió el 30% de su actividad.

Tabla 7. Pasos de purificación de Alt1p. El extracto inicial se obtuvo a partir del cultivo de la cepa CLA1-2-D1M en MM con glucosa-L-alanina, crecidas a fase exponencial (DO_{600nm} 0.4-0.6). U: Unidades; Actividad específica: $\mu\text{moles min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$

Paso de purificación	Volúmen (ml)	U/ml	Total U	mg/ml proteína	Proteína total	U/mg Actividad Específica	% Rendimiento	Factor
Extracto Crudo	21	37.76	792.96	3.25	68.25	11.61	100	1
Precipitación con sulfato de amonio (35%)	2	206.59	413.18	1.28	2.56	161.39	52	14
Intercambio iónico fracción 116 (pH 8.5)	2	84.64	169.29	0.068	0.136	622.39	21	53.6

Figura 12. Determinación de los valores de K_s y V_{max} . Para α -KG (A) la velocidad inicial se obtuvo variando la concentración de α -KG mientras se mantiene constante la L-alanina (400 mM) (B). Para L-alanina se calcularon manteniendo fija la concentración de α -KG (24 mM) y variando la L-alanina.



La fracción 116 en glicerol al 50% se utilizó para realizar una cinética preliminar con el objeto de conocer si las condiciones del ensayo (concentraciones de α -KG y L-alanina) eran las adecuadas. La actividad enzimática se midió en la dirección de la biosíntesis de piruvato y glutamato. En el panel A de la

Figura 12, se muestra la hipérbola que se obtiene al variar las concentraciones de α -cetoglutarato y mantener la concentración de L-alanina fija (400 mM). Se calculó que Alt1p tiene una K_s α -KG aparente de 2.82 mM y una V_{max} aparente de 238.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, lo cuál nos indica que la concentración de α -KG utilizada en los ensayos es adecuada (24 mM está por encima de las 5 K_s recomendadas). Por otra parte, en el panel B de la Figura 12 se muestra la hipérbola que se obtiene al variar las concentraciones de L-alanina utilizando una concentración fija de α -KG (24 mM), utilizando el mismo criterio expuesto. Se determinó que Alt1p tiene una K_s L-Ala aparente de 23.31 mM y una V_{max} aparente de 209.6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nuevamente, el valor de la K_s L-Ala indica que la concentración de L-alanina empleada es adecuada. Sin embargo, es importante señalar que hasta el momento se desconoce si la proteína del extracto utilizado para estos ensayos corresponde a la Alt1p procesada o si incluye al péptido señal.

DISCUSIÓN

La retención de ALT1 y ALT2 y el metabolismo facultativo. La duplicación genómica en un ancestro de *S. cerevisiae* tuvo un impacto importante sobre la evolución de esta levadura y de otras especies emparentadas, se cree que pudo ser el evento que facilitó su adaptación al crecimiento anaerobio, así como el mecanismo que definió su especiación (Wolfe y Shields, 1997; Lynch y Conery, 2000; He y Zhang, 2005). Entender porqué genes se retuvieron en duplicado es relevante para comprender la aportación de la poliploidización en la evolución fenotípica y en el caso particular de *S. cerevisiae*, sobre el establecimiento del metabolismo facultativo. El presente trabajo, se propuso estudiar la aportación de los parálogos *ALT1* y *ALT2* al metabolismo de la L-alanina durante el crecimiento fermentativo y el respiratorio, para analizar si son redundantes o si se han subfuncionalizado y si esto se relaciona con la adaptación al metabolismo facultativo.

Los resultados del presente trabajo muestran que *ALT1* y *ALT2* no son redundantes fisiológicamente: Alt1p tiene una clara función como alanina aminotransferasa la cual no puede ser reemplazada por Alt2p en ninguna de las condiciones ensayadas. Se encontró que la participación de Alt1p en el metabolismo de la L-alanina difiere en condiciones fermentativas y respiratorias: durante la fermentación Alt1p tiene un papel importante en el catabolismo de la L-alanina, mientras que la biosíntesis es llevada a cabo por una vía independiente a las ALTs; por otra parte, en condiciones donde se favorece el metabolismo respiratorio, la vía alterna de biosíntesis no opera y Alt1p es indispensable tanto para la biosíntesis como para el catabolismo de la L-alanina. Como se indica en la literatura y en las bases de datos, en la levadura no se ha descrito un enzima como la alanina deshidrogenasa que catabolice la L-alanina para la obtención de NH_4^+ , y en este trabajo se demuestra experimentalmente que dicha función recae exclusivamente en Alt1p.

Por otra parte, se determinó que *ALT2* no puede sustituir a *ALT1* en principio porque no comparte con ella su patrón de expresión. Independientemente de los cambios que pudo haber sufrido la región codificante de *ALT2* a lo largo de su historia evolutiva y de cómo ésto pudo afectar la localización y las propiedades

fisicoquímicas de la proteína, es evidente el impacto de la divergencia de la región promotora. No se logró detectar la expresión de *ALT2* en las condiciones estudiadas, lo que explica la ausencia de fenotipo en la mutante así como de actividad enzimática. Alt2p sólo es capaz de sustituir a Alt1p parcialmente cuando las células se someten a condiciones de crecimiento respiratorio con NH_4^+ como fuente de nitrógeno, y únicamente cuando se sobreexpresa a través del uso de un plásmido multicopia. Lo anterior señala que *ALT2* debe expresarse, aunque sea mínimamente en esta condición, descartando que sea un pseudogen, a la vez que muestra que Alt2p es una proteína funcional que posiblemente haya conservado un papel asociado a la biosíntesis del aminoácido. Sin embargo, también indica que las diferencias en la regulación de la expresión *ALT1* y *ALT2* han sido determinantes para establecer su no redundancia funcional. Mientras *ALT1* se expresa tanto en condiciones fermentativas como en respiratorias e incrementa su transcripción en respuesta a la L-alanina, evidenciando su rol en el catabolismo, la expresión de *ALT2* parece haberse restringido a condiciones de crecimiento muy particulares e indican que dicho gen pudo haber perdido parte de su función ancestral o inclusive adquirido funciones nuevas, que no fueron identificadas en este trabajo.

El estudio comparativo de las las vías de biosíntesis de aminoácidos en 14 especies de hemiascomicetos, parece apoyar en cierta medida esta propuesta (Blank *et al.*, 2005). En ese trabajo se analizaron tanto especies que pasaron, así como de especies que no pasaron por el evento de paleopoliploidización, y se mostró que por su localización subcelular así como por similitud de secuencia, Alt1p correspondería a la isoenzima más parecida a la ALT ancestral. Por lo tanto, sería a través de Alt1p que ocurriría la mayor parte de la síntesis de L-alanina en este grupo de organismos, lo cuál coincide con los resultados del presente trabajo. Esto permitiría proponer que al quedar la función de transaminasa de L-alanina asegurada por la actividad de Alt1p, el gen *ALT2* quedó libre de las presiones de selección para ir acumulando mutaciones y pudo diversificarse. Sin embargo, debido a que no se lograron identificar las condiciones que evidenciaran la participación *ALT2*, no se pudo determinar en que consiste su posible subfuncionalización o inclusive si se ha neofuncionalizado. El estudio de la transaminasa de L-alanina de *Kluyveromyces waltii* o *K. lactis*, especies que no pasaron por el evento de duplicación ancestral, podría ayudar a comprender cuál era la

posible función ancestral de las ALTs, cómo se ha repartido esta función entre *ALT1/ALT2* y si *ALT2* se ha neofuncionalizado, en que consiste dicha nueva función, así como de que manera se ha relacionado con la adaptación al metabolismo facultativo. Otra alternativa para esclarecer el papel de *ALT2* sería a través de la construcción de quimeras, donde se intercambien los promotores de la pareja *ALT1/ALT2*; a través de estas construcciones, se evidenciará la capacidad de Alt2p para realizar la función de Alt1p y la importancia de la localización subcelular en determinar su actividad.

El mecanismo más directo para la subfuncionalización y la neofuncionalización de proteínas duplicadas es a través de la divergencia de las regiones regulatorias de los genes que las codifican (Lynch y Force, 2000), y se ha estimado que ocurre en el 70% de los genes duplicados de *S. cerevisiae* (Kellis *et al.*, 2004). El análisis de la expresión de todos los duplicados formados por el evento de paleopoliploidización en función de las oscilaciones metabólicas asociadas al régimen facultativo (Chen *et al.*, 2008), mostró que los patrones de expresión de *ALT1* y *ALT2* oscilan de forma contrastante en respuesta a condiciones de crecimiento fermentativas y respiratorias, por lo que se considera que su retención podría estar asociada a la adaptación al metabolismo facultativo. Sin embargo, el perfil de oscilación de ambos genes difiere, lo que se toma como un indicio de la posible subfuncionalización, neofuncionalización o algún proceso intermedio en estos genes.

Un patrón similar se observa para la pareja *GDH1/GDH3*, en los cuales se ha demostrado su subfuncionalización asociada al metabolismo facultativo, que resulta directamente de la regulación diferencial de la expresión de *GDH3* en condiciones fermentativas y respiratorias (Avendaño *et al.*, 1997; De Luna *et al.*, 2001). Lo anterior contrasta con lo encontrado para la pareja *LYS20/LYS21*, donde ambos genes oscilan, lo que indica su relación con el metabolismo facultativo, pero el patrón de expresión de los genes se sobrelapa, por lo que se propone que los genes pudieran tener funciones redundantes o que ambas se requieren para un crecimiento óptimo. Lo anterior en cierta forma coincide con el estudio fisiológico de *LYS20/LYS21* donde se mostró que si bien estos genes no se expresan diferencialmente, es

probable la existencia de un mecanismo postranscripcional que regule la presencia de Lys20p en condiciones respiratorias (Quezada *et al.*, 2008). En el caso de la pareja *ALT1/ALT2* falta por definir si *ALT2* se inserta efectivamente dentro del contexto del metabolismo facultativo, o si la transcripción en condiciones respiratorias detectada por Chen *et al.* (2008), obedece a que el crecimiento en etanol representa una condición de estrés nutricional, condición a la cual se ha relacionado el incremento de la expresión de *ALT2* (Gasch *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004).

Biosíntesis de L-alanina durante el metabolismo fermentativo. La acumulación de L-alanina como un subproducto de la glucólisis se ha reportado en organismos donde este proceso se lleva a cabo de manera activa, sobretodo cuando se imponen condiciones de anaerobiosis. Aunque en *P. furiosus* y en mamíferos la síntesis de L-alanina parece ser llevada a cabo esencialmente por las ALTs (Kengen *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 2000), en *Arabidopsis thaliana* el uso de mutantes ha indicado que existe una vía alternativa que opera en raíces hipóxicas, la cual no se ha identificado. En este sistema las transaminasas de L-alanina se vuelven necesarias una vez que se reestablecen las condiciones de normoxia, y cumplen una importante función en el catabolismo de dicho aminoácido, el cual se utiliza como fuente de esqueletos de carbono y de NH_4^+ (Miyashita *et al.*, 2007). Debido a que en *S. cerevisiae* se ha reportado la actividad de ALT, así como la existencia de *ALT1* y *ALT2* en su genoma, se ha asumido que la síntesis del aminoácido ocurre principalmente por vía de estas enzimas.

En su estudio, Chico *et al.* (1978) reportaron en *S. cerevisiae*, la producción de L-alanina en cultivos con fuentes de carbono fermentables, tanto aeróbicos como anaeróbicos, así como en células que tienen una actividad respiratoria comprometida (mutantes *petite*). En este estudio no se describieron a las enzimas implicadas; sin embargo, detectaron actividad de ALT (0.046 y 0.06 $\mu\text{moles mg de proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en cultivos aeróbicos y anaeróbicos, respectivamente), por lo cual señalaron a una alanina aminotransferasa como la enzima responsable de la producción de L-alanina. Por otra parte, también mostraron que la concentración de L-alanina liberada al medio aumenta en mutantes *petite* con respecto a

la cepa silvestre (de 60 a 160 nmoles/10mg de peso seco), a pesar de que la actividad de ALT disminuye a la mitad. Estos resultados podrían representar el primer indicio de que la producción de L-alanina durante la glucólisis ocurre por una vía distinta a las ALTs, aunque los autores no discuten nada al respecto. En el presente trabajo se demuestra que las ALTs no son indispensables para llevar a cabo la biosíntesis de la L-alanina en condiciones fermentativas, ya que ni las mutaciones *alt1Δ*, *alt2Δ*, ni *alt1,2Δ* tienen un efecto sobre el fenotipo, lo que evidencia la existencia de una vía alterna para la biosíntesis de dicho aminoácido.

Entonces ¿de dónde proviene la L-alanina que se forma durante el crecimiento fermentativo en la levadura?

El análisis del flujo de C¹³ a través del metabolismo central durante el crecimiento aeróbico y anaeróbico de *S. cerevisiae*, ha mostrado resultados contradictorios en lo que respecta a dónde se produce la L-alanina como consecuencia de la actividad de alanina aminotransferasas. Maaheimo *et al.* (2001) plantean que en condiciones fermentativas, la L-alanina se obtiene a partir del piruvato que produce la enzima málica, por lo que se infiere una localización mitocondrial tanto de la enzima como del sitio de síntesis del aminoácido. Sin embargo, en otro estudio, Frick y Wittmann (2005) encuentran que durante el crecimiento fermentativo una fracción de la síntesis de L-alanina ocurre en la mitocondria, aunque la mayor parte se produce en el citosol y a medida que incrementa la función respiratoria, la síntesis de L-alanina se traslada hacia la mitocondria, a la cual se limita completamente una vez que se ha establecido el metabolismo aeróbico. De estos datos y de acuerdo con las observaciones del presente trabajo, se podría interpretar que la biosíntesis de L-alanina pasa de una vía alterna, que no se ha definido si es citosólica o mitocondrial que opera durante la fermentación, a la Alt1p mitocondrial que funciona predominantemente durante la respiración. Hasta el momento la vía alternativa para la biosíntesis de L-alanina no se ha identificado; sin embargo, de acuerdo a la revisión de la literatura y de las bases de datos, existen algunas posibles candidatas, ya que su función se ha descrito para *S. cerevisiae*: la cisteína desulfurasa (EC: 2.8.1.7), la transaminasa de alanina-glioxilato (*AGX1*) (EC: 2.6.1.44) o la

transaminasa de glutamina (EC: 2.6.1.15).

La cisteína desulfurasa es una enzima altamente conservada en todos los dominios de la vida, y en *S. cerevisiae* su mutación es considerada como letal. Se localiza principalmente en la mitocondria, aunque existe una isoforma nuclear, y forma parte de un sistema para movilizar azufre para la síntesis o reparación de proteínas FE/S bajo estrés oxidativo, así como para llevar a cabo el cargado de tRNA's. La reacción catalizada por la cisteína desulfurasa es la primera dentro de una serie en donde se obtiene azufre a partir de la cisteína utilizando a un intermediario persulfato y produciendo L-L-alanina (Mühlenhoff *et al.*, 2004). Aunque la L-alanina se obtiene como un subproducto de dicha reacción es poco probable que ésta constituya una vía central en su producción, además de que corresponde a una enzima funcional tanto en condiciones respiratorias como fermentativas, algo que de acuerdo a nuestros resultados no realiza la supuesta vía alternativa.

Por su parte, la Agx1p lleva a cabo la reacción de transaminación entre la L-alanina y el glioxilato para producir piruvato y glicina. En la levadura *AGX1* está codificada por el gen YFL030w. Sin embargo, a pesar de que en teoría la reacción catalizada por la Agx1p es reversible, *in vivo* únicamente lleva a cabo el catabolismo de la L-alanina para producir piruvato y glicina y sólo en condiciones respiratorias (Takada y Noguchi, 1985), ya que durante la fermentación la expresión del gen está reprimida (Schlösser *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, resulta improbable que corresponda a la vía alternativa de producción de L-alanina, ya que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que esta vía debiera ser funcional principalmente en condiciones fermentativas.

Una tercera candidata para vía alterna de biosíntesis de L-alanina durante la fermentación es la transaminasa de glutamina. Esta vía opera exclusivamente bajo condiciones fermentativas (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989), una condición que coincide con las observaciones del presente trabajo; enlazando la biosíntesis de la L-alanina con los ciclos de síntesis y degradación del glutamato-glutamina.

La glutamina juega un papel clave en el metabolismo nitrogenado; además de que provee alrededor del 15-20% del nitrógeno requerido para la biosíntesis de diferentes intermediarios metabólicos (Magasanik y Kaiser, 2002), tiene también un papel regulatorio y actúa como co-represor durante la

respuesta catabólica nitrogenada, por lo que en general su concentración en la célula está cuidadosamente controlada. En la levadura, su síntesis la lleva a cabo la glutamino sintetasa (GS, codificada por *GLN1*), mientras que su catabolismo es mediado por la glutamato sintasa (GOGAT, codificada por *GLT1*) que utiliza a la glutamina como fuente de NH_4^+ para producir glutamato, por lo que en general es considerada más bien como una enzima de biosíntesis de glutamato (Cogoni *et al.*, 1995). También participan dos glutaminasas, que catalizan la desamidación reductiva de la L-glutamina para formar L-glutamato y NH_4^+ (Soberón y González, 1987a); así como por dos transaminasas de glutamina, la cuales operan como parte de la ruta de la transaminasa de glutamina- ω amidasa y catalizan la transaminación fisiológicamente irreversible de la L-glutamina con diferentes oxo-ácidos para formar el aminoácido respectivo y 2-oxoglutamato (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989). Si el oxo-ácido en cuestión es el piruvato, la reacción produce L-alanina (Cooper y Meister, 1973; Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989; Durán y Calderón, 1995). Aunque no se han identificado en la levadura los genes que codifican para las glutaminasas y las glutamino-aminotransferasas, su actividad enzimática se ha detectado a través de ensayos específicos (Soberón y González, 1987a,b; Soberón *et al.*, 1989).

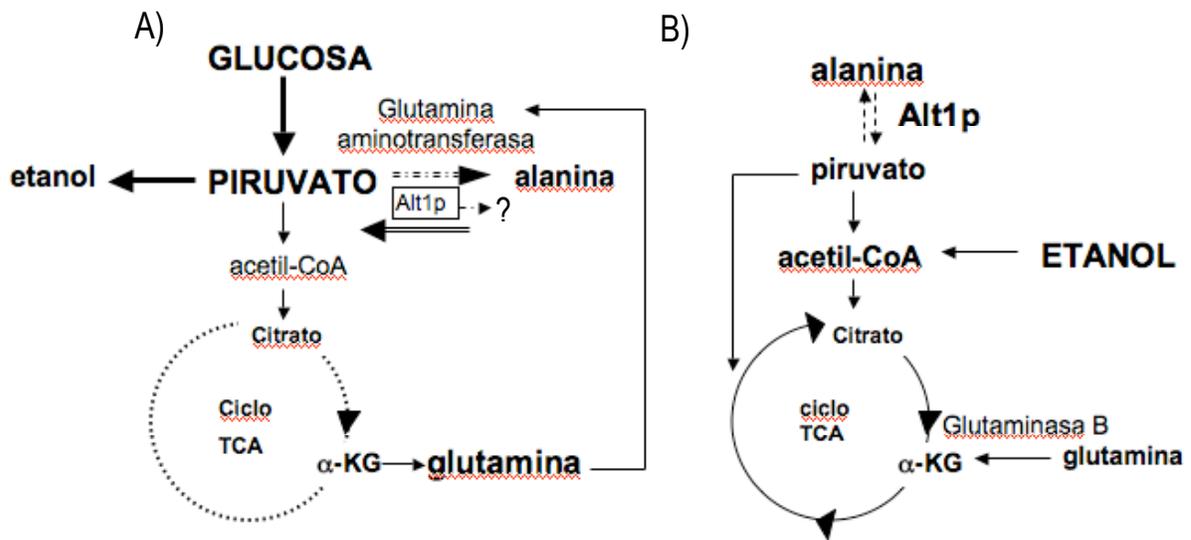
Un aspecto interesante acerca de las vías de degradación de la glutamina a través de las glutaminasas y glutamino-aminotransferasas es que no llevan a cabo su función de manera simultánea y parecen haberse especializado en distintas fases del metabolismo facultativo; la glutaminasa B (la glutaminasa con la mayor actividad detectada) se inhibe en concentraciones altas de piruvato, como las que se presentan durante la fermentación y en cultivos microaerófilicos, por lo que actúa principalmente durante el metabolismo respiratorio (Soberón y González, 1987a). Por otra parte, cuando se favorece el metabolismo anaerobio, durante la microaerofilia o cuando se compromete la función respiratoria (en mutantes *petite*) y se acumula piruvato como consecuencia de un aumento en la glucólisis, se inhibe a la glutaminasa y se induce a las transaminasas de glutamina, que utiliza el piruvato como sustrato produciendo la L-alanina (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989).

Se considera que ambas vías forman parte de un ciclo de síntesis y degradación de la glutamina, que tiene un papel importante en regular los niveles de dicho aminoácido en la célula, a la vez que participa en mantener el equilibrio entre las tasas de síntesis y degradación del nitrógeno celular por la función que tiene la glutamina de corepresor en la represión catabólica nitrogenada (Mora, 1990; Durán y

Calderon, 1995). Al regularse a través de las concentraciones de piruvato, este ciclo se integra al metabolismo central del carbono, proporcionando a través de la transaminasa de glutamina un mecanismo en el cual se puede controlar la concentración del piruvato producida durante la fermentación, estimulando el flujo de carbono a través de las reacciones generadoras de energía (Mora, 1990), y sirviendo a la vez como un “mecanismo de homeostasis” que permite preservar el amonio y los esqueletos de carbono en la forma de aminoácidos (a través de las reacciones de transaminación, la glutamina provee el 20% del amonio utilizado por la célula) (Cooper y Mesiter, 1977). La L-alanina producida por esta vía puede ser luego catabolizada para recuperar los niveles de glutamato y piruvato, en condiciones en las cuales éstos son limitantes.

Dentro de este posible esquema, la función de Alt1p se ha adaptado a las necesidades del metabolismo facultativo: durante la fermentación cuando se encuentran altas concentraciones de piruvato, se obtiene la síntesis neta de L-alanina a través de la reacción fisiológicamente irreversible de la transaminasa de glutamina, donde la función de Alt1p sería principalmente hacia el catabolismo de dicho aminoácido (Figura 13, Panel A). Sin embargo, durante el crecimiento respiratorio, cuando las concentraciones de piruvato se vuelven limitantes, la transaminasa de glutamina no opera (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989) y toda la actividad biosintética y catabólica recae en Alt1p (Figura 13, Panel B). En este sentido la actividad de Alt1p puede funcionar como un mecanismo que permite modular la utilización y la biosíntesis equilibrada del piruvato de manera diferencial en condiciones fermentativas y respiratorias.

Figura 13. Modelo donde se esquematiza la participación de Alt1p y de la glutamina aminotransferasa en el metabolismo de la L-alanina durante el crecimiento fermentativo (A) y respiratorio (B). (\rightleftharpoons) en glucosa con NH_4^+ como fuente de nitrógeno; (\Rightarrow) en glucosa y L-alanina como fuente de nitrógeno. La aportación de Alt1p a la biosíntesis de L-alanina en condiciones fermentativas (glucosa- NH_4^+) no se logró determinar, debido a la existencia de una vía alterna para la obtención del aminoácido.



Catabolismo de L-alanina en condiciones fermentativas. El fenotipo de crecimiento de las cepas silvestre y *alt2Δ* en MM glucosa-L-alanina, muestra que Alt1p es la única enzima responsable del catabolismo de la L-alanina en la levadura. Por otra parte, indica que a pesar de que el catabolismo de la L-alanina genera piruvato y glutamato, los cuales son directamente asimilables por el metabolismo celular, la L-alanina no representa una fuente de nitrógeno tan buena como el NH_4^+ , ya que las cepas crecen a la mitad de la velocidad detectada en MM glucosa- NH_4^+ . Esto difiere un poco de lo encontrado en la cepa $\Sigma 1278b$, donde la L-alanina se considera como una buena fuente de nitrógeno, aún si no es una fuente de nitrógeno preferencial, ya que es capaz de mantener el 80% de la velocidad de crecimiento en comparación al crecimiento en NH_4^+ (Godard *et al.*, 2007).

El que la L-alanina pueda sea una buena fuente de nitrógeno para la levadura depende de varios factores: (i) de la eficiencia con la cuál puede ser introducida a la célula, en el caso de la L-alanina, se han descrito 5 permeasas que son capaces de transportarla al interior de la célula, (Regenberg *et al.*, 1999). Su entrada depende de la presencia de dichas permeasas y de la competencia con otros aminoácidos; aunque se sabe que los genes *GAP1*, *PUT4* y *DIP5*, que codifican para las principales permeasas de L-alanina incrementan su expresión en presencia del aminoácido (Usaite *et al.*, 2006). (ii) de la eficiencia de Alt1p para producir el glutamato requerido para el funcionamiento celular. Por último, (iii) que la producción de glutamato por medio de Alt1p se enlace adecuadamente a las vías encargadas de la asimilación del NH_4^+ y la formación de

glutamina. Se sabe que *GDH2*, la glutamato deshidrogenasa NAD^+ dependiente, encargada del catabolismo de glutamato para producir NH_4^+ y α -cetoglutarato, esta regulada por la fuente de carbono y que se reprime en presencia de altas concentraciones de glucosa (Coschigano *et al.*, 1991); por lo que es posible que parte de limitante de utilizar L-alanina como única fuente de nitrógeno durante la fermentación se deba precisamente a las limitaciones en el uso posterior de la glutamato.

Biosíntesis y catabolismo de la L-alanina en condiciones respiratorias. A diferencia de lo observado durante el crecimiento en glucosa, cuando las células se crecen en una fuente de carbono no fermentable la mutante *alt1* Δ se comporta como un auxótrofo; es decir, Alt1p es la única enzima responsable de la biosíntesis de la L-alanina. Esto coincide con los datos obtenidos acerca del flujo de C^{13} en el metabolismo central durante el crecimiento respiratorio, donde muestran que en esta condición toda la L-alanina sintetizada se obtiene a partir del piruvato producido por la enzima málica y por tanto proviene de la mitocondria (Frick *et al.*, 2005).

Por otro lado, Alt1p tiene un papel catabólico que es indispensable para mantener un crecimiento silvestre cuando se utiliza una fuente de carbono no fermentable. Cuando se utiliza etanol, la obtención de energía ocurre a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y los esqueletos de carbono para esta función se asimilan en forma de acetato para producir acetyl-CoA el cual se utiliza en el ciclo (Figura 12, panel B). Debido a que en estas condiciones se requieren de los intermediarios del ciclo para mantener su funcionamiento y la síntesis de ATP, el crecimiento requiere que exista un equilibrio de la función biosintética del ciclo, que no comprometa la obtención de energía. Las rutas anapleróticas juegan un papel muy importante en mantener este equilibrio, proporcionando una vía para la obtención de estos intermediarios a través del catabolismo de diferentes metabolitos.

Los resultados del presente trabajo muestran que en ausencia de Alt1p no hay crecimiento cuando se utiliza una fuente de carbono no fermentable. El crecimiento se recupera solo parcialmente cuando se emplean simultáneamente el NH_4^+ y la L-alanina como fuentes de nitrógeno, una condición en

la cual no se requiere ni de la biosíntesis ni del catabolismo del aminoácido. Es decir, la adición de L-alanina sólo cubre las necesidades por el aminoácido para la síntesis proteica; sin embargo, se requiere de piruvato y glutamato, los productos de su catabolismo, para tener un crecimiento normal; lo que le confiere a Alt1p un posible rol como parte de las vías anapleróticas.

En este sentido, el piruvato formado puede ser utilizado para generar oxaloacetato vía la piruvato carboxilasa el cual puede incorporarse a la vía gluconeogénica o puede ser directamente utilizado como metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Asimismo, a través de la piruvato deshidrogenasa puede producirse acetil CoA para su incorporación al ciclo. Por otra parte, la producción de glutamato por la actividad de la alanino aminotransferasa permite reciclar NH_4^+ ayudando a mantener las pozas de glutamato y glutamina. El papel de la L-alanina y las alanino aminotransferasas en este contexto ha sido estudiado en los túbulos renales proximales del conejo en cultivos celulares crecidos en acetato como fuente de carbono (no fermentable). A través del monitoreo de ^{13}C de L-alanina y acetato marcados, se encontró un aumento en el flujo a través de la mayoría de estas enzimas que le permiten a la célula incorporar con mayor eficiencia el carbono del acetato, disminuyendo su pérdida como CO_2 (Conjard *et al.*, 2002), lo que sugiere un papel muy interesante para las alanino aminotransferasas durante el crecimiento en sustratos no fermentables o malas fuentes de carbono.

En síntesis, Alt1p actúa aparentemente de manera simultánea, y en el mismo compartimento, como una enzima biosintética y catabólica, indispensable tanto para la producción de L-alanina para la síntesis de proteínas, como para la producción del piruvato y glutamato requeridos para sostener el funcionamiento del ciclo de Krebs. Cómo la levadura regula este ciclo de biosíntesis-catabolismo por Alt1p y evita el establecimiento de un ciclo "futil", no está del todo claro. Para la levadura se ha descrito que existen oscilaciones cíclicas en la acumulación de ciertos aminoácidos, sobretudo para aquellos que se sintetizan a partir de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, particularmente de la L-alanina, la valina, la leucina, la serina, la lisina, la asparagina y el aspartato (Hans *et al.*, 2003). Por lo tanto, es

posible que el funcionamiento de Alt1p se relacione con el establecimiento de estos ciclos, en donde primeramente se requiere alcanzar un umbral en la acumulación de L-alanina para que se inicie la función catabólica. De ser cierto, se esperaría que la cantidad de Alt1p tenga también un comportamiento oscilatorio, en donde se mantenga a niveles bajos en condiciones que promueven la síntesis de L-alanina, y aumenten cuando se requiere su catabolismo. Los resultados del presente trabajo muestran que en presencia de altas concentraciones de L-alanina, se induce la expresión de *ALT1*, así como se incrementa notoriamente la cantidad de la proteína y la actividad enzimática, todo lo cual en inicio apoya esta propuesta.

Purificación de Alt1p. En los organismos donde se ha reportado la purificación y la caracterización de las transaminasas de L-alanina se indica que estas proteínas forman homodímeros y no se ha señalado la formación de heteroligómeros. El peso molecular de los monómeros de las ALT's en diferentes organismos varía entre 46 y 61 kDa (Tabla 2); mientras que para Alt1p de *S. cerevisiae* se ha calculado un peso de 66.4 kDa, aunque en esta estimación se incluye la secuencia del péptido señal (de localización mitocondrial). A la fecha se desconoce realmente cuál es el tamaño de dicha presecuencia, aunque de acuerdo con el programa MITOPROT, el posible sitio de corte se encuentra en el aminoácido 86, lo que generaría una proteína de aproximadamente 56.93 kDa. La electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) de las fracciones provenientes de los distintos pasos de purificación mostró el enriquecimiento de una banda entre los 50 y 75 kDa (~60 kDa), lo cual coincide aproximadamente con el peso teórico propuesto.

Por otra parte, en lo que respecta a la determinación de la forma oligomérica de Alt1p, la estimación del peso molecular por medio de la cromatografía de filtración en gel (Superdex 200) del extracto crudo, mostró un pico con actividad máxima que permitió calcular un peso de aproximadamente 160 kDa para Alt1p, por lo cual es probable que forme homodímeros. Aunque en este estudio se partió de extractos crudos de la cepa CLA1-2-D1M y es imposible obtener heteroformas, el hecho de que Alt2p no se encuentre presente en las condiciones estudiadas vuelve improbable la presencia de heteroformas Alt1p/Alt2p en condiciones

fermentativas naturales, por lo que el homodímero Alt1p/Alt1p sería la forma fisiológicamente significativa. Si bien el peso calculado para ALt1p se encuentra por encima de los 120-140 kDa esperados para un homodímero, es bien conocido que la resolución en la columnas pueden verse afectada por diversos factores, incluyendo el estado del empaque de la columna misma, la longitud de la columna, la interacción de las moléculas con las partículas de la columna, la forma y tamaño de la proteína, etc. Utilizar una columna cromatográfica más grande, así como realizar una electroforesis de proteínas nativas, podría ayudar a establecer el tamaño y la forma oligomérica con mayor precisión.

Para la mayoría de las transaminasas de alanina que se han purificado y para las cuales se ha determinado su cinética enzimática, se ha establecido que presentan una cinética Michaeliana típica para sus sustratos, lo cuál coincide con nuestros resultados. Alt1p tiene una K_s L-ala similar a lo encontrado para la isoforma citosólica de la rata, el cerdo y el humano (Hopper y Segal, 1962; DeRosa y Swick, 1975; Gubern *et al.*, 1999). Sin embargo, si se compara con los valores de afinidad por sus sustratos obtenidos para otras especies (Tabla 2) los valores aquí determinados son considerablemente más altos. Es posible que el ensayo requiera ser afinado para poder obtener una cinética más detallada. Asimismo, se vuelve necesario establecer si la proteína con la cuál se esta trabajando contiene la presecuencia mitocondrial o si ésta ya se ha procesado, ya que pueden encontrarse poblaciones mixtas en el extracto que afecten los resultados obtenidos. Sin embargo, estos ensayos sientan las bases sobre las cuales se puede continuar con la purificación de Alt1p a homogeneidad.

Un aspecto que quizás resulte significativo y que vale la pena explorar a mayor profundidad es la baja afinidad de Alt1p por la L-alanina. Esto indica dos cosas: (i) Alt1p podría tener una mayor capacidad para biosintetizar L-alanina que para catabolizarla y dicha función se controla en la célula limitando la cantidad de enzima producida así como la disponibilidad de los sustratos. Tanto en condiciones fermentativas como respiratorias en las cuales se favorece la biosíntesis de L-alanina, la expresión del gen y la cantidad de Alt1p se mantiene baja y probablemente este limitada a la disponibilidad del piruvato producido por la enzima málica

(Maaheimo *et al.*, 2001; Frick *et al.*, 2005). En condiciones respiratorias, la poza de piruvato citosólico se utiliza para alimentar el ciclo de Krebs para la obtención de energía y para la gluconeogénesis; mientras que en condiciones fermentativas, el piruvato producido durante la glucólisis lo cooptan otras vías, mayoritariamente por la piruvato descarboxilasa y posiblemente por la transaminasa de glutamina, que se sabe aumenta su actividad 10 veces en respuesta a la acumulación de este ceto-ácido (Soberón y González, 1987b; Soberón *et al.*, 1989). (ii) La baja afinidad por L-alanina indica que la función catabólica de Alt1p se logra cuando hay concentraciones altas de L-alanina, donde además se promueve la transcripción del gen, así como el aumento en la cantidad de proteína. Estas observaciones podrían también reforzar la propuesta de que la concentración de Alt1p se regula con base a las fluctuaciones en las concentraciones de L-alanina. La afinidad de Alt1p por el piruvato y el glutamato se debe confirmar en un ensayo donde se analice la reacción reversa, así como el efecto de Alt1p sobre la pozas de piruvato, de glutamato, de glutamina y de L-alanina.

La función de ALT2. Los datos obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que *ALT2* ha disminuido su capacidad de participar en el metabolismo de L-alanina. Una posible interpretación de estas observaciones podría ser que *ALT2* está en vías de pseudogenizarse o que pudiera haber adquirido una función diferente que no fue posible identificar bajo las condiciones ensayadas. La observación de que en etanol-amonio la cepa con *ALT2* en multicopia es capaz de reponer parcialmene el crecimiento, cuando se compara con la doble mutante que no crece en esta condición, indica que es prematuro suponer que dicho gen ha perdido su actividad. La pérdida del péptido de señalización mitocondrial en *ALT2* no es un hecho menor y pudo ser instrumental para la modificación de la actividad de esta proteína. A través de análisis de expresión globales se ha mostrado que existen condiciones donde este gen aumenta su expresión. Los casos más evidentes son después de varios días de crecimiento estacionario en medio rico, donde se reporta que *ALT2* aumenta cerca de 28 veces (Gasch *et al.*, 2000); así como bajo condiciones en las cuales se limita la fuente de carbono (glucosa o etanol), donde aumenta hasta 50 veces (Wu *et al.*, 2004). Aunque probablemente existan diferencias fundamentales en el estado fisiológico

de las levaduras de ambos experimentos, el aspecto que ambos tienen en común es el estado de limitación de carbono.

La privación de carbono es una señal para que tanto las células haploides como diploides entren en fase estacionaria. Durante la fase estacionaria, las células además de encontrarse en un medio empobrecido de carbono, también se encuentran limitadas por otros nutrientes importantes para mantener su crecimiento, como el nitrógeno, fósforo, etc., por lo cual es difícil especular acerca de cuál es la posible función de *ALT2* durante este período. En esta etapa se considera que las células tienen muy baja actividad metabólica, incluyendo una baja tasa de síntesis proteica y de transcripción (Martínez *et al.*, 2004). Asimismo, se sabe que se reprime la expresión de genes involucrados en la secreción, en la síntesis de la membrana y pared celular, y de aquellos implicados en el progreso del ciclo celular, así como en el metabolismo de aminoácidos (Gasch *et al.*, 2000), por lo cual el aumento en la transcripción de *ALT2* pudiera parecer inicialmente sorprendente; sin embargo, para cuando entran en un estado quiescente, las células en general muestran una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que les permiten resistir los efectos del estrés ambiental. Es posible que *ALT2* de alguna manera esté respondiendo a estas señales de estrés; quizás aportando al catabolismo de la L-alanina para producir piruvato y glutamato, ya que es una fase donde la gluconeogénesis cobra importancia, además de que la célula busca y utiliza fuentes alternas de energía; o al revés, actuando en su biosíntesis, como una vía a través del cual se puede obtener también α -cetoglutarato, para mantener la capacidad respiratoria de las células, o como parte del ciclo del glioxilato, como respuesta al estrés oxidativo, donde la *AGX1* usa la L-alanina sintetizada como sustrato.

No obstante, en el presente trabajo no se logró detectar la actividad de Alt2p en cultivos prolongados de YPD con el ensayo enzimático propuesto. Es posible que el aumento reportado en la transcripción del gen no se corelacione necesariamente con una mayor cantidad de la proteína; pero no se puede descartar la posibilidad de que el ensayo para medirlo no haya sido adecuado, o que la proteína sea altamente inestable y las condiciones de extracción hostiles, por lo cual el manejo resultara deficiente. Sería importante reanalizar la expresión de *ALT2* en estas condiciones, con cepas del fondo genético usado en este trabajo; asimismo, determinar la presencia de la proteína por inmunolocalización como una

alternativa para explorar bajo que condiciones resulta más factible encontrar a la proteína, para diseñar un nuevo protocolo de determinación de actividad enzimática.

Para poder comprender el significado fisiológico de esta duplicación génica, y particularmente del papel de *ALT2*, se hace necesario llevar a cabo estudios que permitan distinguir, tanto desde el punto de vista funcional de la proteína como el de la regulación de su expresión, su aportación al metabolismo.

CONCLUSIONES

A través del análisis del fenotipo de las mutantes *ALT1/ALT2*, del patrón de expresión de los genes y de la determinación de la actividad enzimática, en condiciones donde se contrasta el metabolismo fermentativo y respiratorio, así como la participación de las enzimas en la biosíntesis y catabolismo de L-alanina, se logró conocer algunos de los aspectos básicos de su papel en el metabolismo de este aminoácido y en la fisiología de la levadura.

1.- *ALT1* y *ALT2* no son fisiológicamente redundantes. La conservación de los parálogos *ALT1/ALT2* se debe a que probablemente a que se han subfuncionalizado. *ALT1* tiene claramente una función de transaminasa de alanina; induce su expresión como respuesta a la L-alanina y participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de dicho aminoácido; *ALT2* no puede sustituir su función y su actividad parece limitarse a condiciones muy particulares que no fueron exploradas en este trabajo.

2.- La biosíntesis de L-alanina en condiciones fermentativas ocurre por una vía alternativa que no incluye a las ALT's. Cuando se favorece la fermentación en un cultivo, la cepa doble mutante *alt1Δalt2Δ* no es auxótrofa para L-alanina; es decir, la célula obtiene el aminoácido por una vía distinta a las ALT's. Aunque esta vía no se ha identificado, existen evidencias para proponer a la ruta de degradación de glutamina catalizada por la transaminasa de glutamina como candidata a realizar esta función. Por su parte, el catabolismo de la L-alanina en condiciones fermentativas se lleva a cabo exclusivamente a través de Alt1p. Esto indica en el contexto del metabolismo fermentativo Alt1p se ha subespecializado hacia el catabolismo.

3.- En condiciones respiratorias Alt1p es indispensable para mantener el crecimiento. En presencia de una fuente de carbono no fermentable, Alt1p es indispensable tanto para la biosíntesis como para el catabolismo de la L-alanina, y no hay otra vía que la sustituya. Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que su función en el catabolismo es particularmente importante ya que al proporcionar glutamato y piruvato, es muy posible que participe en el

sostenimiento de las vías anapleróticas.

4.- ALT2 puede tener un papel menor en la biosíntesis de L-alanina en condiciones respiratorias. *ALT1* y *ALT2* no son redundantes porque en principio no comparten el mismo patrón de expresión. En la mayoría de las condiciones ensayadas en este trabajo la expresión de *ALT2* se encuentra reprimida. Sin embargo, Alt2p puede sustituir parcialmente a Alt1p cuando se sobreexpresa en condiciones donde se favorece la biosíntesis de L-alanina durante el metabolismo respiratorio, lo que indica que es una enzima funcional y que pudiera participar en la biosíntesis del aminoácido.

5.- Se logró establecer un protocolo para la purificación parcial de Alt1p. Un objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la caracterización cinética de Alt1p y Alt2p. Sin embargo, no se lograron establecer las condiciones que permitieran medir a Alt2p. Por ello se procedió únicamente con la purificación de Alt1p. La adición de piridoxal-5-fosfato (100 μ M) al extracto crudo permitió la estabilización de la enzima Alt1p, lo cual permitió la determinación de las actividades enzimáticas de los cultivos, así como montar un protocolo para la purificación de la enzima. A través de este protocolo, aunque no se purificó a homogeneidad, se logró purificar la proteína por un factor de 88. Se determinó que Alt1p probablemente forme homodímeros y que tiene una K_s $_{\alpha$ -KG aparente de 2.82 mM y una K_s $_{L$ -ala aparente de 23.31 mM.

PERSPECTIVAS

1.- Uno de los aspectos más notorios de este trabajo es la no redundancia de *ALT1/ALT2*. Los resultados de este trabajo y la revisión bibliográfica sugieren que estos parálogos se han subfuncionalizado y que parte importante de dicha subfuncionalización se relaciona a que los genes tienen patrones de la expresión distintos y las proteínas localizaciones subcelulares diferentes. Aunque en este trabajo se exploró su subespecialización como una posible adaptación metabolismo facultativo, es probable que la retención de Alt2p se deba a que forma parte de algún mecanismo de respuesta a condiciones de estrés. La importancia fisiológica de Alt2p sigue siendo una pregunta abierta.

2.- Los resultados de este trabajo indican que la expresión de *ALT2* está reprimida bajo las condiciones estudiadas. ¿Son las diferencias en el patrón de expresión la principal causa de que *ALT2* no pueda sustituir a *ALT1* en su función?. ¿Por qué se ha limitado tanto la expresión de *ALT2* y cuáles son los mecanismos moleculares que están implicados?. Un estudio más profundo de la expresión de estos genes, así como la construcción de quimeras donde se intercambie el promotor y la presecuencia de localización mitocondrial, podrían ayudar a resolver parte de estas interrogantes.

3.- Debido a que no se lograron definir las condiciones que permitieran la determinación de la actividad enzimática de Alt2p, no se pudo llevar a cabo su purificación para realizar una comparación de las propiedades cinéticas de Alt1p y Alt2p. Por ello, se desconoce todavía el posible impacto de los cambios en las propiedades de la enzima sobre su funcionamiento, ni cuál es su posible significado fisiológico.

4.- Es poco lo que se ha estudiado con respecto al metabolismo de la L-alanina en la levadura y en los hemiascomicetos en general, por lo que una de las principales aportaciones de este trabajo en ese sentido, ha sido la de establecer que durante la fermentación existe una vía distinta a las ALT's que funciona como la principal ruta para la biosíntesis de dicho aminoácido. Entonces, ¿Cuál es la

ruta alternativa? En este trabajo se propone a la transaminasa de glutamina. Sin embargo, aunque se ha descrito en la levadura la actividad para la enzima, aún no se ha identificado al gen responsable. Identificar el gen responsable y caracterizar su función sería importante para completar el mapa existente de las rutas metabólicas en la levadura.

6.- *ALT1* es la primera alanino aminotransferasa descrita que aparentemente lleva a cabo de manera simultánea la biosíntesis y el catabolismo de la L-alanina. Durante la fermentación parece haberse subfuncionalizado hacia un papel catabólico, dejando la biosíntesis a una ruta alternativa. Sin embargo, durante la respiración es la única enzima responsable de realizar el metabolismo de la L-alanina; un aspecto interesante a estudiar es cómo se mantiene el equilibrio entre el papel biosintético y catabólico de la enzima, en el contexto fisiológico de la levadura.

REFERENCIAS

- Anaya-Muñoz, V.H. 2005. Análisis funcional de dos genes para alanino aminotransferasas hipotéticas en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22:195-201.
- Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L. y González, A. 1997. *GDH3* encodes a glutamate dehidrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosíntesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179(17): 5594-5597.
- Blank, L.M., Lehmbeck, F. y Sauer, U. 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetes yeasts. *FEMS Yeast Res.* 5: 545-558.
- Calderon, J., Morett, E. y Mora, J. 1985. ω -amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 161(2): 807-809.
- Carroll, S.B. 2001. Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*. 409:1102-1109.
- Chen, H., Xu, L. y Gu, Z. 2008. Regulation dynamics of WGD genes during yeast metabolic oscillation. *Mol Biol Evol.* Epub ahead of print Sept 23.
- Chico, E., Olavarria, J.S. y Núñez de Castro, I. 1978. L-alanine as an end product of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under different hypoxic conditions. *Antonie van Leeuwehoek*. 44: 193-201.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. y Hieter, P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*. 110: 119-122.
- Chu, S., DeRisi J., Eisen M., Mulholland J., Botstein D., Brown P.O. y Herskowitz I. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*. 282(5389):699-705.
- Clark, S.M., Di Leo, R., Dhanoa P.K., Van Cauwenberghe O.R., Mullen R.T. y Shelp, B.J. 2009. Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an *Arabidopsis* -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *J. Exp. Bot.* 60(6):1743-1757.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P., and González, A. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* 177(3):792-798.
- Conant, G.C. y Wolfe, K.H. 2007. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Molecular Systems Biology*. 3(129):1-12.

- Conjard, A., Dugelay, S., Chauvin, M.F., Durozard, D., Baverel, G. y Martin, G. 2002. The anaplerotic substrate alanine stimulates acetate incorporation into glutamate and glutamine in rabbit kidney tubules, a ^{13}C NMR study. *J. Biol. Chem.* 277(33): 29444-29454.
- Cooper, A.J.L. y Meister, A. 1973. Glutamine transaminases from liver and kidney. *En: Prusiner, S. y Stadtman, E.R. (Eds). The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press Inc. New York-London.*
- Cooper, A.J.L. y Meister, A. 1977. The glutaminase- ω -amidase pathway. *Critical Rev. Biochem.* 4:281-303.
- Coschigano, P.W., Millar, S.M. y Magasanik, B. 1991. Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11(9): 4455-4465.
- De Bodt, S. Maere, S. y Van der Peer, Y. 2005. Genome duplications and the origin of angiosperms. *Trends Ecol.Evol.* 20(11):591-597.
- De Luna, A., Avendaño, A., Riego, L. y González, A. 2001. NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276(47):43775-43783.
- DeLuna, A. 2002. Redundancia génica en *Saccharomyces cerevisiae*: estudio bioquímico y fisiológico de las glutamato deshidrogenasas anabólicas. Tesis de Doctorado, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
- DeRosa, G. y Swick, R. 1975. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 250(20):7961-7967.
- Dietrich, F.S. *et al.* 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science.* 304: 304-307.
- Dujon, B., Sherman D., Fischer, G., *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Durán, S. y Calderón, J. 1995. Role of the glutamine transaminase- ω -pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology.* 141: 589-595.
- Edwards, M.R., Gilroy, F.V., Jimenez, B.M. y O'Sullivan, W.J. 1989. Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biochem. Parasitology.* 37: 19-26.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale IV, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. y Butow, R.A. 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol.Biol.Cell.* 12(2):297-308.
- Freeling, M. y Thomas, B.C. 2006. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide

- predictable drive to increase morphological complexity. *Genome Res.* 16:805-814.
- Freimoser, F.M., Hürlinmann, H.C., Jacob, C.A., Werner, T.P. y Amrhein, N. 2006. Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. *Genome Biology.* 7:R109-
- Frick, O. y Wittmann, C. 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microbial Cell Factories.* 4(30):1-16.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G. y Brown, P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental change. *Mol. Biol. Cell.* 11(12):4241-4257
- Giaever *et al.* 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418: 387-391.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J. y André, B. 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27(8):3065-3086.
- Goffeau, A *et al.* 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274:563-567
- Goffeau, A. 2004. Seeing double. *Nature.* 430: 25-26.
- Goldstein, A.L. y McCusker, J.H. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15: 1541-1553.
- Good, A.G. y Crosby, W.L. 1989. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol.* 90: 1305-1309.
- Gu, X., Wang, Y. y Gu, J. 2002. Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small- scale duplications in vertebrate evolution. *Nature Genetics.* 31: 205-209.
- Gubern, G., Imperial, S., Busquets, M. y Cortés, A. 1999. Partial characterization of the alanine aminotransferase isoenzymes from human liver. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1288-1289.
- Hans, M.A., Heinzle, E. y Wittmann, C. 2001. Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 776-779.
- Hans, M.A., Heinzle, E. y Wittmann, C. 2003. Free intracellular amino acid pools during autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech and Bioeng.* 82(2): 143-151.
- Hatch, M.D. 1973. Separation and properties of leaf aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes operative in the C4 pathway of photosynthesis. *Arch.*

Biochem.Biophys. 156:207-214.

- He, X. y Zhang, J. 2005. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*. 169:1157-1164.
- Hernandez-Montes, G., Diaz-Mejia, J., Perez-Rueda, E. y Segovia, L. 2008. The hidden universal distribution of amino acids biosynthetic networks: a genomic perspective on its origins and evolution. *Genome Biol.* 9:R95
- Hillenmeyer, M.E., Fung, E., Wildenhain, J., Pierce, S.E., Hoon, S., Lee, W., Proctor, M., St.Onge, R.P., Tyers, M., Koller, D., Altman, R.B., Davis, R.W., Nislow, C. y Giaeever, G. 2008. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science*. 320:362-365.
- Hopper, S. y Segal, H.L. 1962. Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine transaminase. *J. Biol. Chem.* 237(10): 3189-3195.
- Hsiao, T.L. y Vitkup, D. 2008. Role of duplicate genes in robustness against deleterious human mutations. *PLOS genetics*. 4(3): e1000014.
- Huang, S., y O'Shea, E.K. 2005. A systematic high-throughput screen of a yeast deletion collection for mutants defective in *PHO5* regulation. *Genetics*. 169: 1859-1871.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. y O'Shea, E.K. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 425(6959):686-91.
- Jadaho, S.B., Yang, R.Z., Lin, Q., Hu, H., Anania, F., Shuldiner, A.R. y Gong, D.W. 2004. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology*. 39(5): 1297-1302.
- Kanamori, K., Legerton, T.L., Weiss, R.L. y Roberts, J.D. 1982. Effect of the nitrogen source on glutamine and alanine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 257(23):14168-14172.
- Kellis, M., Birren B.W. and Lander E.S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 428: 617-624.
- Kengen, S.W.M. y Stams, A.J.M. 1994. Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation and hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch. Microbiol.* 161: 168-175.
- Kuepfer, L., Saber, U. y Blank, L.M. 2005. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen. Res.* 15:1421-1430.
- Lain-Guelbenzu, B., Cárdenas, J. y Muñoz-Blanco, J. 1991. Purification and properties of L-alanine

- aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 202:881-887.
- Lenartowicz, E. y Wojtczak, A.B. 1988. Significance of the alanine aminotransferase reaction in the formation of α -ketoglutarate in rat liver mitochondria. *J. Biochem and Biophys.* 260 (1): 309-319.
- Liepmann, A.H. y Olsen, L.J. 2003. Alanine aminotransferase homologs catalize the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131:215-227.
- Liti, G. y Louis, E.J. 2005. Yeast evolution and comparative genomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:135-153.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75.
- Lynch, M y Conery, J.S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 290: 1151-1155.
- Lynch, M. y Force, A. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics.* 154: 459-473.
- Maaheimo, H., Fiaux, Cakar, Z.P., Bailey, J.E., Sauer, U. y Szyperski, T. 2001. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ^{13}C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* 268:2464-2479.
- Magasanik, B. y Kaiser, C.A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 290:1-18.
- Maltsev, N., Glass, E. M., Ovchinnikova, G. y Gu, Z. 2005. Molecular mechanisms involved in robustness of central metabolism against null mutations. *J. Biochem.* 137: 17-187.
- Marland, E., Prachumwat, A., Maltsev, N., Gu, Z. y Li W.H. 2004. Higher gene duplicabilities for metabolic proteins than for nonmetabolic proteins in Yeast and *E.coli*. *J. Mol.Evol.* 59(6): 806-814.
- Martinez, M.J., Roy, S., Archuleta, A.B., Wentzell, P.D., Anna-Arriola, S.S., Rodríguez, A.L., Aragon, A.D., Quiñones, G.A., Allen, C., Werner-Washburne, M. 2004. Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Mol. Biol. Cell.* 15(12): 5295-5305.
- McCowen, S.M. y Phibbs Jr., P.V. 1974. Regulation of alanine dehydrogenase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 118(2): 590-597.
- Meneghini, M.D., Wu, M. y Mandan H.D. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell.* 112(5): 725-736.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. y Compagno, C. 2007. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J.* 274: 976-989.

- Messenguy, F., Colin, D. y Ten Have, J.P. 1980. Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic controls. *Eur. J. Biochem.* 108: 439-447.
- Metón, I., Egea, M., Fernández, F., Eraso, M.C. y Baanante, I.V. 2004. The N-terminal sequence directs import of mitochondrial aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters.* 566:251-254.
- Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond K.P. y Good, A.G. 2007. Alanine aminotransferase catalyzes the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49:1108-1121.
- Miyashita, Y. y Good, A. 2008. Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.* 49(1):92-102.
- Mora, J. 1990. Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev.* 54(3): 293-304.
- Mühlenhoff, U., Balk, J., Richardt, N., Kaiser J.T., Sipos, K., Kispal, G. y Lill, R. 2004. Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279(35): 36906-36915.
- Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K. y Kagamiyama, H. 2004. Yeast Nsf1 is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J. Biol. Chem.* 279(13): 12363-12368.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G. y Marton, M.J. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21(13):4347-4368.
- Ohta, M. 2003. Evolution by gene duplication revisited: differentiation of regulatory elements versus proteins. *Genetica.* 118: 209-216.
- Olson, B.J.S.C. y Markwell, J. 2007. Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science.* 3.4.1-3.4.29
- Otto, S.P. y Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu.Rev.Genet.* 34:401-437.
- Payne, S.H., y W.F. Loomis. 2006. Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole genome sequences. *Eukaryotic Cell.* 5(2): 272-276.
- Piskur, J. 2001. Origin of the duplicated regions in the yeast genome. *Trends in Genetics* 17(6): 302-303.
- Prince, V.E. y Pickett, F.B. 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nature Reviews: Genetics.* 3: 827-836
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna A., Hernández H., Calcagno M.L., Marín-Hernández A. y

- González A. 2008. Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 154: 1656-1667.
- Rajamohan, F., Nelms, L., Joslin, D.L., Lu, B., Reagan, W.J. y Lawton, M. 2006. cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanine aminotransferase-1. *Protein Expression and Purification* 48:81-89.
- Ravot, G., Ollivier, B., Fardeau, M.L., Patel, B.K., Andrews, K.T., Magot, M. y García, J.L. 1996. L-alanine production from glucose fermentation by hyperthermophilic members of the domains *Bacteria* and *Archaea*: a remnant of an ancestral metabolism?. *Appl. Environ. Microb.* 62(7):2657-2659.
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M.C. y Holmberg, S. 1999. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.* 36: 317-328.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisnger, C. y Sickmann, A. 2006. Towards the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* 5: 1543-1554.
- Ricoult, C., Echeverria, L.O., Cliquet, J.B. y Limami, A.M. 2006. Characterization of alanine aminotransferase (*AlaAT*) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Experimental Botany*. 57(12):3079-3089.
- Segal, H.L. y Matsuzawa, T. 1970. L-Alanine aminotransferase (Rat Liver). In: Methods in Enzymology, Methods of amino acids and amines. Academic Press Vol. XVIIa: 153-159.
- Seoighe C. y Wolfe K.H. 1999. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 548-554.
- Scherens, B., Feller, A., Vierendeels, F., Messenguy, F. y Dubois, E. 2006. Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS Yeast Res.* 6: 777-791.
- Schlösser, T., Gätgens, C., Weber, U., y Stahmann, K.P. 2004. Alanine:glyoxylate aminotransferase of *Saccharomyces cerevisiae*-encoding gene *AGX1* and metabolic significance. *Yeast*. 21: 63-73.

- Schwartz, M.K. 1970. Clinical aspects of aspartate and alanine aminotransferases. In: Methods in Enzymology, Methods of amino acids and amines. Academic Press Vol. XVIIa: 866-875.
- Sikorski, R.S. y Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122: 19-27.
- Soberón M., y González, A. 1987a. Physiological role of glutaminase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1-8.
- Soberón M., y González, A. 1987b. Glutamine degradation through the ω -amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 9-14.
- Soberón M., Olamendi, J., Rodríguez, L., y González, A. 1989. Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2693-2697.
- Son, D. y Sugiyama, T. 1992. Molecular cloning of an alanine aminotransferase from a NAD-malic enzyme type C4 plant *Panicum miliaceum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 705-713.
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. y Winston, F. 2000. Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*. 97(7):3364-3369.
- Takada, Y. y Noguchi, T. 1985. Characteristics of alanine:glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine biosynthesis from tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem. J.* 231: 157-163.
- Tsacopoulos, M., Veuthey, A.L., Saravelos, S.G., Perrottet, P. y Tsoupras, G. 1994. Glial cells transform glucose to alanine which fuels neurons in the honey bee retina. *J. Neuroscience*. 14(3): 1339-1351.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*. 76:4350-4354.
- Umemura, I., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Sato, T. y Tosa, T. 1994. Purification and properties of alanine aminotransferase from *Candida maltosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(2):283-287.
- Umemura, I., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Sato, T. y Tosa, T. 1996. A *Candida maltosa* mutant defective in alanine aminotransferase: isolation and L-alanine assimilation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 45(4):519-524.
- Usaitte R., Patil, K.R., Grotjær, Nielsen, J. y Regenber, B. 2006. Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ammonium, L-alanine, or

- L-glutamine limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 6194-6203.
- Valenzuela, L., Aranda, C. y González, A. 2001. TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* 183:2331-2334.
- Van der Kaaij, H., Desiere, F., Mollet, B. y Germond, J.E. 2004. L-alanine auxotrophy of *Lactobacillus johnsonii* as demonstrated by physiological, genomic, and gene complementation approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3): 1869-1873.
- Vedavathi, M., Girish, K.S. y Kumar, K. 2005. A novel low molecular weight alanine aminotransferase from a fasted rat liver. *Biochemistry.* 71:S105-S112.
- Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W. 2006. Fundamentals of Biochemistry, life at the molecular level. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Ward, D.E., Kengen S.W.M., van der Oost, J. y de Vos W.M. 2000. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine metabolism. *J. Bacteriol.* 182(9): 2559-2566.
- Wolfe, K.H. y Shields, D.C. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 387: 708-713.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes A., Panoutsopolou, K. y Oliver, S.G. 2004. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *PNAS.* 101(9): 3148-3153.
- Yang, R.Z., Blaileanu, G., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R. y Gong, D.W. 2002. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics.* 79(3): 445-450.
- Yang, R.Z., Park, S., Reagan, W.J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., Rajamohan, F., Qian, K., Liu, L. y Gong, D.W. 2009. Cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology.* 49 (2): 598-607.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. y Broach, J.R. 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu.Rev.Genet.* 42: 2.1-2.55.

ALT1*-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae

Florencia García-Campusano, Víctor-Hugo Anaya, Luis Robledo-Arratia, Héctor Quezada, Hugo Hernández, Lina Riego, and Alicia González

Abstract: In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the paralogous genes *ALT1* and *ALT2* have been proposed to encode alanine aminotransferase isozymes. Although in other microorganisms this enzyme constitutes the main pathway for alanine biosynthesis, its role in *S. cerevisiae* had remained unclear. Results presented in this paper show that under respiratory conditions, Alt1p constitutes the sole pathway for alanine biosynthesis and catabolism, constituting the first example of an alanine aminotransferase that simultaneously carries out both functions. Conversely, under fermentative conditions, it plays a catabolic role and alanine is mainly synthesized through an alternative pathway. It can thus be concluded that *ALT1* has functions in alanine biosynthesis and utilization or only alanine utilization under respiratory and fermentative conditions, respectively. *ALT2* expression was repressed under all tested conditions, suggesting that Alt2p biosynthesis is strictly controlled and only allowed to express under peculiar physiological conditions.

Key words: alanine metabolism, *ALT1*, *ALT2*.

Résumé : Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes paralogues *ALT1* et *ALT2* codent vraisemblablement des isozymes de l'alanine aminotransférase. Quoique cette enzyme constitue la voie principale de biosynthèse de l'alanine chez d'autres microorganismes, son rôle chez *S. cerevisiae* demeure obscur. Les résultats présentés dans cet article démontrent que lors de la respiration, Alt1p constitue la seule voie de biosynthèse et de catabolisme de l'alanine, constituant le premier exemple d'une alanine aminotransférase qui possède simultanément les deux fonctions. À l'inverse, lors de la fermentation, elle joue un rôle catabolique et l'alanine est synthétisée par une voie alternative. On peut donc conclure que *ALT1* possède des fonctions dans la biosynthèse et l'utilisation de l'alanine, ou dans l'utilisation de l'alanine seulement, lors de la respiration et la fermentation respectivement. L'expression de *ALT2* était réprimée dans toutes les conditions étudiées, ce qui suggère que la biosynthèse de Alt2p est strictement contrôlée et que l'enzyme ne s'exprime que sous des conditions physiologiques particulières.

Mots-clés : métabolisme de l'alanine, *ALT1*, *ALT2*.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Pathways for the biosynthesis and catabolism of amino acids have been thoroughly studied in *Saccharomyces cerevisiae*; however, the exact nature of the routes leading to alanine biosynthesis and catabolism have remained unclear and no alanine auxotrophs have been isolated.

Three major biosynthetic pathways for alanine biosynthesis have been identified in bacteria: reductive amination of pyruvate by alanine dehydrogenase (AlaD) (McCowen and Phibbs 1974; Feng et al. 2002), decarboxylation of L-aspartate by aspartate-4-decarboxylase (AspD) (Wang and Lee 2006), and transamination from other amino acids to pyruvate via

aminotransferases (Wang et al. 1987). The first 2 enzymes show no orthologous counterparts in fungal, mammalian and plant systems, and thus, isozymes of alanine-pyruvate aminotransferase have been considered to constitute the main pathway leading to alanine biosynthesis and catabolism in these organisms (Chico et al. 1978; de Sousa and Sodek 2003; Gatehouse et al. 1967; Umemura et al. 1994). In mammalian, fungal, and bacterial systems, an alternative pathway for alanine biosynthesis can be achieved through the action of the glutamine-pyruvate aminotransferase that forms part of the ω -amidase pathway (Cooper and Meister 1977; Calderon et al. 1985; Soberon and Gonzalez 1987; Soberon et al. 1989; Duran et al. 1995). Furthermore; in

Received 27 August 2008. Revision received 23 November 2008. Accepted 9 December 2008. Published on the NRC Research Press Web site at cjm.nrc.ca on .

F. García-Campusano, V.-H. Anaya, L. Robledo-Arratia, H. Hernández, and A. González.¹ Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, Mexico City, D.F. 04510, Mexico.
H. Quezada. Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Tlalpan, Mexico City, D.F. 14070, Mexico.
L. Riego. División de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José No 2055 Lomas, Cuarta Sección 78216, San Luis Potosí, Mexico.

¹Corresponding author (e-mail: amanjarr@ifc.unam.mx).

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Genotype
CLA1-2	<i>MATα ALT1 ALT2 ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-1	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 ALT2 ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-2	<i>MATα ALT1 alt2Δ::kanMX4 ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-D	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 alt2Δ::natMX ura3 leu2:: LEU2</i>
CLA1-2-DC	CLA1-2-D/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-D1C	CLA1-2-D/pMON1 (<i>ALT1</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-D2C	CLA1-2-D/pMON2 (<i>ALT2</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-DM	CLA1-2-D/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-D1M	CLA1-2-D/pMUL1 (<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-D2M	CLA1-2-D/pMUL2 (<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-2-M	CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)

S. cerevisiae, it has been proposed that under fermentative conditions, the concerted action of a pyruvate-dependent glutamine aminotransferase and the ω -amidase could constitute an alanine biosynthetic pathway (Soberon et al. 1989); however, this route cannot provide a catabolic pathway, since the reaction catalyzed by glutamine aminotransferase is irreversible (Soberon et al. 1989).

In *S. cerevisiae*, the paralogous genes *ALT1* and *ALT2* have been proposed to encode alanine aminotransferases; however, no experimental evidence has been put forward to demonstrate their participation in alanine biosynthesis (Chico et al. 1978). To analyze the enzymes encoded by these 2 genes in *S. cerevisiae*, single and double mutants in these genes were studied. Results presented in this paper indicate that (i) in aerobic glucose-grown cultures (respiro-fermentative conditions) Alt1p plays a catabolic role and alanine biosynthesis is achieved through an alternative pathway, (ii) under respiratory conditions alanine is exclusively biosynthesized and catabolized through Alt1p, and (iii) *ALT2* expression was repressed in all tested conditions, thus, its physiological role remains unclear. Alt1p constitutes the first example of an alanine aminotransferase that simultaneously degrades and biosynthesizes alanine. The nature of the alternative pathway leading to alanine biosynthesis under fermentative conditions is discussed.

Materials and methods

Strains

Table 1 describes the characteristics of the strains used in the present work. Construction of strain CLA1-2 (*ura3 leu2::LEU2*) has been previously described (Quezada et al. 2008). To obtain the *alt1 Δ* mutant strain (CLA1-2-1), CLA1-2 was transformed with the 2612 bp PCR product containing the *kanMX4* cassette and *ALT1* upstream (756 bp) and downstream (263 bp) nucleotide sequences, amplified from the genomic DNA of the Euroscarf collection strain Y02700, using the deoxyoligonucleotides ALT1Fo (5'-TCTTGCACGGTTCGCATCTCTCG-3') and ALT1Re (5'-GATTAACGGGTGTTCTCGAACTACGC-3'). To obtain the *alt2 Δ* mutant (CLA1-2-2), CLA1-2 was transformed with the 2860 bp PCR product containing the *kanMX4* cassette and *ALT2* upstream (1078 bp) and downstream (186 bp) nucleotide sequences amplified from the genomic DNA of the Euroscarf collection strain Y04045 using the deoxyoligonucleotides ALT2Fo (5'-GAAATAGCACCCACAGAGGCAGG-

3') and ALT2Re (5'-ACAATAGATGCAGAGGAATGCTCC-3'). Transformed cells were selected for G418 resistance (200 mg/L; Life Technologies). Mutants were verified by PCR using their corresponding forward deoxyoligonucleotides and the reverse deoxyoligonucleotide Kan3Rev (5'-GGCAGTTCCATAGGATGGCA-3'), which amplify the 5'-flanking region of the genes and an internal fragment of the *kanMX4* cassette, originating a 1924 bp product for *alt1 Δ ::kanMX4* and a 2244 bp product for *alt2 Δ ::kanMX4*. The *alt1::kanMX4 alt2::natMX* double mutant CLA1-2-D was constructed as follows: the *kanMX4* cassette from CLA1-2-2 was replaced by the *natMX* cassette, which confers resistance to the antibiotic nourseothricin (Goldstein and McCusker 1999). The *natMX* cassette used for transformation was obtained from the digestion of plasmid p4339 with *EcoRI*. Transformants were selected for nourseothricin resistance (100 mg/L, clonNAT) and sensitivity to G418. Correct insertion was verified by PCR using the deoxyoligonucleotides ALT2Fo and Nat1Re (5'-TAAGCCGTGTCGTCAAGAGTGG-3'), which amplify a 1496 bp fragment that includes 1 078 bp of the 5' *ALT2*-flanking region and a 418 bp fragment of the *natMX* cassette. CLA1-2-2b (*alt2 Δ ::natMX*) was then transformed with the *alt1 Δ ::kanMX4* cassette obtained from the strain Y02700 as described earlier, and then selected for G418 and nourseothricin double resistance; the insertion was verified by PCR as described for CLA1-2-1.

Growth conditions

Strains were routinely grown on MM containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter sterilized glucose (2% *m/v*) or ethanol (2% *v/v*) was used as a carbon source and the nitrogen source is specified in the Results and discussion section. Uracil was added at 20 mg/L and 7 mmol/L alanine was used as a nitrogen source or to supplement growth on MM. Cultures were grown at 30 °C and 250 rev/min.

Construction of low- and high-copy-number plasmids bearing *ALT1* or *ALT2* genes

Standard molecular biology techniques were followed as described by Sambrook et al. (1989). *ALT1* or *ALT2* was PCR amplified together with their respective 5'-promoter sequence and cloned into either the pRS316 (*CEN ARSH4 URA3*) low-copy-number or the pRS426 (2 μ ori *URA3*) high-copy-number plasmid (Sikorski and Hieter 1989;

Table 2. Specific growth rates (h^{-1}) of the strains.

Strain	Glucose		Ethanol		
	NH ₄	Alanine	NH ₄	NH ₄ + alanine	Alanine
CLA1-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.31±0.02	0.16±0.010	0.09±0.003	0.09±0.004	0.09±0.001
CLA1-2-M [(CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))]	0.27±0.002	0.15±0.003	0.07±0.004	0.09±0.003	0.07±0.001
CLA1-2-1 (<i>alt1</i> Δ <i>ALT2</i>)	0.26±0.028	—	—	0.04±0.003	—
CLA1-2-2 (<i>ALT1 alt2</i> Δ)	0.29±0.032	0.17±0.002	0.09±0.003	0.09±0.005	0.08±0.001
CLA1-2-D (<i>alt1</i> Δ <i>alt2</i> Δ)	0.27±0.017	—	—	0.05±0.002	—
CLA1-2-DC [CLA1-2-D/pRS316 (<i>CEN URA3</i>)]	0.26±0.010	—	—	0.05±0.004	—
CLA1-2-D1C [CLA1-2-D (<i>ALT1 CEN URA3</i>)]	0.28±0.010	0.15±0.003	0.07±0.005	0.08±0.001	0.08±0.001
CLA1-2-D2C [CLA1-2-D (<i>ALT2 CEN URA3</i>)]	0.26±0.010	—	—	0.05±0.001	—
CLA1-2 DM [CLA1-2-D/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	0.27±0.015	—	—	0.04±0.003	—
CLA1v2-D1M [CLA1-2-D (<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.26±0.002	0.13±0.004	0.07±0.003	0.08±0.001	0.07±0.002
CLA1-2-D2M [CLA1-2-D (<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.27±0.003	—	—	0.04±0.002	—

Note: Cells were grown on minimal media with the indicated carbon source. Specific growth rate was determined during exponential phase. Values are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Units are h^{-1} . —, Strain did not grow under this condition.

Christianson et al. 1992). For *ALT1*, a 2798 bp fragment was PCR amplified using the ALT1Fo and ALT1Re deoxyoligonucleotides; for *ALT2*, a 2786 bp fragment was PCR amplified with the deoxyoligonucleotides ALT2Fo and ALT2Re, with genomic DNA from strain BY4741. These fragments were cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and subcloned into either *NotI* or *EcoRI* digested pRS426 generating plasmids pMUL1 and pMUL2 (*ALT1* or *ALT2* 2 μ *URA3*), or into either the *NotI* or the *EcoRI* digested pRS316, generating plasmids pMON1 and pMON2 (*ALT* or *ALT2 CEN URA3*). These constructs were used to transform the double mutant CLA1-2-D, thus generating strains CLA1-2-D1M, CLA1-2-D2M, CLA1-2-D1C and CLA1-2-D2C. Control strains CLA1-2-M, CLA1-2DM were constructed by independently transforming the wild-type strain CLA1-2 and the CLA1-2-D double mutant with plasmid pRS426; strain CLA1-2-DC was obtained by transforming strain CLA1-2-D with plasmid pRS316. All transformants were selected for uracil prototrophy.

Cell extract preparation and alanine aminotransferase enzymatic assay

Yeast cells were grown to exponential phase ($OD_{600} = 0.4-0.6$), harvested by centrifugation, and washed with cold buffer (100 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.3, 1 mmol/L EDTA). Pellets were suspended in cold extraction buffer (100 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.3, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) and mechanically disrupted with glass beads. The resulting extract was centrifuged to eliminate cellular debris (14 000 rev/min, 4 °C, 20 min), the supernatant was recovered, and pyridoxal-5'-phosphate was added to a 100 mmol/L final concentration. The enzymatic assay was a modified version of the method reported by Segal and Matsuzawa (1970). The reaction mixture contained 100 mmol/L potassium phosphate buffer [(pH 7.3), 400 mmol/L alanine, 24 mmol/L α -ketoglutarate, 40 μ mol/L pyridoxal-5'-phosphate, 250 μ mol/L NADH, 2 U/ μ L of lactate dehydrogenase (LDH)]. All assays were performed at 30 °C in a Varian Cary 50 spectrophotometer. After 5 min of thermal equilibration, the assay was started by addition of cell extract. The protein concentration was measured using the method of Lowry et al. (1951), with BSA as the standard.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Protein extracts obtained from Yeast TAP-tagged strains obtained from OPEN Biosystems (YDR111c-TAP and YLR089c-TAP), were subjected to SDS-PAGE, performed with 10% slab gels, and transferred to nitrocellulose membranes. Incubation with antibodies was carried out as described elsewhere (Towbin et al. 1979). Anti-TAP rabbit polyclonal antibody (CAB1001; OPEN Biosystems) was used at a dilution of 1:500. Anti-Rabbit HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) was diluted 1:700. Immunoblot signaling was optimized by analyzing a number of combinations of antigen and antibody concentrations in the linear range of detection.

Northern blot analysis

Northern blot analysis was carried out as described previously. Total yeast RNA was prepared as described by Struhl and Davis (1981) from exponentially grown cells ($OD_{600} = 0.4-0.6$) in 100 mL cultures. A specific *ALT1* probe was generated as follows: a 1410 bp PCR fragment was amplified with primers ALT1NthnFo (5'-AGACCCGTCCTACAGAGACATAGC-3') and ALT1NthnRe (5'-GCGAGCTTCTTGAAGCTGCCTTGAA-3'). A *BamHI-HindIII* 1599 bp restriction fragment of the actin-encoding gene (*ACT1*) was used as an internal loading stand.

Results and discussion

Alanine metabolism is impaired in *alt1* Δ mutants

To analyze the physiological role of Alt1p and Alt2p, single and double *alt1* Δ and *alt2* Δ mutants were constructed. Results presented in Table 2 show that growth on glucose-ammonium aerated cultures was not affected by impairment of either *ALT1* or *ALT2*; furthermore, the double *alt1* Δ *alt2* Δ mutant grew as well as the wild-type strain. These results show that under respiro-fermentative conditions, alanine biosynthesis proceeds through an *ALT1-ALT2* independent pathway, supporting previous observations, which suggests that under these conditions, alanine is mainly synthesized through the glutamine aminotransferase- ω -amidase pathway (Soberon et al. 1989). The operation of this pathway relies on the concerted action of a pyruvate-dependent glutamine aminotransferase, yielding alanine and α -ketoglutarate, and the

Table 3. Alanine aminotransferase specific activity.

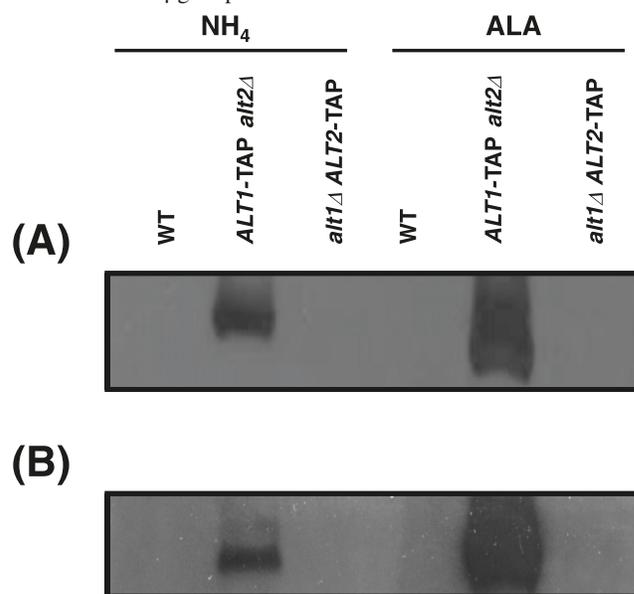
Strain	Glucose		Ethanol		
	NH ₄	Alanine	NH ₄	NH ₄ + alanine	Alanine
CLA1-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.09±0.03	0.72±0.13	0.072±0.02	0.42±0.09	0.37±0.08
CLA1-2-M [(CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))]	0.08±0.02	0.75±0.06	0.071±0.01	0.36±0.03	0.33±0.03
CLA1-2-1 (<i>alt1Δ ALT2</i>)	0.00	—	—	0.00	—
CLA1-2-2 (<i>ALT1 alt2Δ</i>)	0.07±0.02	0.67±0.04	0.081±0.02	0.44±0.02	0.39±0.04
CLA1v2-D (<i>alt1Δ alt2Δ</i>)	0.00	—	—	0.00	—
CLA1-2-DM [(CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))]	0.00	—	—	0.00	—
CLA1-2-D1M [(CLA1-2-D (<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>))]	3.11±0.62	8.11±0.13	3.27±0.76	8.76±0.83	5.6±0.28
CLA1-2-D2M [(CLA1-2-D (<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>))]	0.00	—	—	0.00	—

Note: Cells were grown on minimal media with the indicated carbon source and harvested during exponential growth (OD₆₀₀ = 0.4–0.6). Values are presented as means from 3 independent experiments ± SD. Specific activity is expressed as μmol·min⁻¹·mg of protein⁻¹. —, Strain did not grow under this condition.

ω-amidase, which subsequently hydrolyzes α-ketoglutarate yielding α-ketoglutarate and ammonium (Soberon et al. 1989). Growth on glucose plus alanine as the sole nitrogen source was impaired in either the *alt1Δ* single mutant or the *alt1Δ alt2Δ* double mutant, indicating that Alt1p constitutes the sole pathway for alanine degradation in glucose-grown cells (Table 2). The fact that the reaction catalyzed by glutamine aminotransferase is mainly irreversible, since α-ketoglutarate is readily utilized by the ω-amidase or is immediately cyclized rendering it unavailable for the backward reaction (Calderon et al. 1985), warrants alanine biosynthesis and not its catabolism. Under this condition, alanine utilization proceeds exclusively through Alt1p. The low activity displayed by Alt1p under biosynthetic conditions, with ammonium as the nitrogen source (Table 3), suggests that glutamine aminotransferase would be more likely to utilize pyruvate, since it has been shown that activity of this enzyme is increased 10-fold under fermentative conditions, as compared with that found under respiratory conditions (Soberon et al. 1989).

When ethanol was provided as the sole carbon source and ammonium was provided as the nitrogen source, growth was impaired in an *alt1Δ* genetic background, and it was recovered when the *alt1Δ alt2Δ* double mutant was transformed with centromeric or multicopy plasmids harboring *ALT1*; conversely, plasmids harboring *ALT2* did not allow growth recovery (Table 2). Addition of alanine to the growth medium allowed partial growth of the *alt1Δ* mutants, under these conditions, and wild-type and *ALT1* complemented strains displayed a growth rate that was 2-fold greater than that detected in the *alt1Δ* mutant (Table 2). These results suggest that under respiratory conditions, in the presence of ammonia, Alt1p participates in both alanine biosynthesis and catabolism. Accordingly, when alanine was provided as the nitrogen source in the presence of ethanol as the sole carbon source, growth of strains bearing the *alt1Δ* mutation was impaired and was only recovered when strains were complemented with *ALT1* on centromeric or multicopy plasmids. These results show that alanine catabolism is required for growth on ethanol, probably constituting an ancillary pathway furnishing pyruvate, and that under respiratory conditions, alanine is exclusively synthesized through the operation of Alt1p, indicating that the glutamine aminotransferase-ω-amidase pathway is only prevalent in glucose-grown cultures, playing no role under respiratory conditions.

Fig. 1. Alt1p concentration is increased in the presence of alanine. Cell-free extracts from untagged wild-type strain and *ALT1*-TAP or *ALT2*-TAP tagged strains were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-TAP monoclonal antibody. Cells were grown on glucose (A) or on ethanol (B). Either ammonium (NH₄⁺) or alanine (Ala) was used as the nitrogen source. All lanes were loaded with 100 μg of protein.

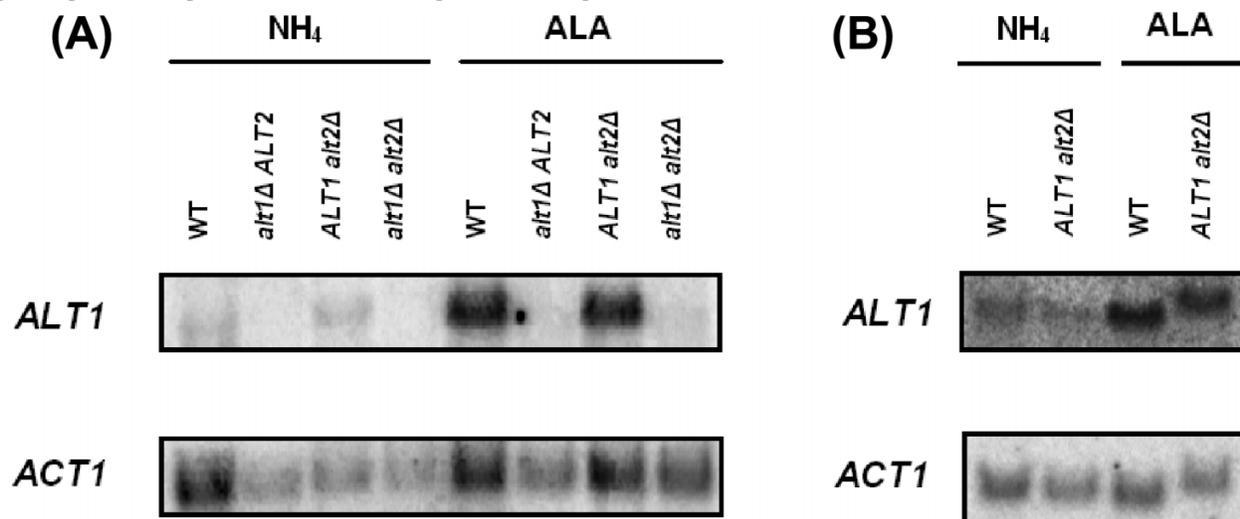


Accordingly, it has been shown that under respiratory metabolism, diminished pyruvate pools impair function of the ω-amidase-pathway (Soberon et al. 1989), therefore, under this condition, alanine biosynthesis cannot proceed through this pathway and is exclusively determined by Alt1p activity. It is worth mentioning that Alt1p has been localized in the mitochondria (Reinders et al. 2006), and thus its function could be maximized under respiratory metabolism.

Alt1p-dependent enzymatic activity is increased in the presence of alanine

Alanine aminotransferase activity was determined in extracts obtained from exponentially grown cultures incubated with either glucose or ethanol as the carbon source. On glucose- or ethanol-grown cultures, Alt1p activity was 6- to 8-fold lower than that detected in the presence of alanine, suggesting that *ALT1* expression could be induced by

Fig. 2. *ALT1* expression is induced in the presence of alanine. Northern blot analysis was carried out on total RNA obtained from the wild-type and mutant strains carrying single or double *alt1Δ* or *alt2Δ* mutations. Cells were grown on 2% glucose (A) or on 2% ethanol (B), with ammonium (NH₄⁺) or alanine (ALA) as nitrogen sources. Filters were probed with the specific *ALT1* PCR product obtained as described in the Materials and methods section. A *Bam*H1–*Hind*III 1599 bp *ACT1* DNA fragment was used as the loading control. Three biological replicates were performed; results of a representative experiment are shown.



this amino acid (Table 3). As expected, complementation with multicopy plasmids harboring *ALT1* increased enzymatic activity. Table 3 shows that, on alanine-supplemented media, with either glucose or ethanol as a carbon source, Alt1p activity showed a 11- to 20-fold increase when compared with the wild-type strain corresponding to the copy number effect (20 copies/cell). However, in media supplemented with ammonium, Alt1p activity in strains harboring *ALT1* on a multicopy plasmid was 34- to 45-fold greater than that observed for the wild-type strain, indicating that under these conditions, Alt1p activity depends on the synergic effect of plasmid copy number and *ALT1*-induced expression provoked by endogenous alanine production. As mentioned earlier, under respiratory conditions with ammonium as the nitrogen source, Alt1p determines both alanine biosynthesis and catabolism; a futile cycle could be avoided by the operation of an inherent homeostatic control determined by the alternation of the biosynthetic and catabolic activity of Alt1p controlled by the intracellular pyruvate and alanine pools.

To determine the relative abundance of Alt1p and Alt2p, Western blot analysis was carried out. As presented in Fig. 1, lanes carrying extracts of the wild-type strains harboring *ALT1*-TAP, grown on glucose or ethanol plus alanine, showed a greater amount of antigen than those obtained from glucose- or ethanol-ammonium grown cells, probably suggesting alanine-induced *ALT1* expression. No antigen was detected in extracts obtained from the untagged wild-type strain or in the wild-type strain harboring *ALT2*-TAP, indicating that lack of Alt2p enzymatic activity correlated with the lack of antigen.

Alanine induces *ALT1* expression

To determine whether increased aminotransferase activity in the presence of alanine was due to increased *ALT1* transcription and to analyze whether *ALT2* was transcribed under the studied conditions, Northern blot analysis was per-

formed. Total RNA was obtained from aerobic glucose or aerobic ethanol grown cultures with either ammonium or alanine as nitrogen sources; Fig. 2 presents results indicating that *ALT1* expression was several fold increased in the presence of alanine on both carbon sources. Although the *ACT1* (actin) signal is not equivalent in all lanes, indicating differences in sample loading, this does not interfere with these conclusions. *ALT2* mRNA was not detected, showing that lack of Alt2p activity was due to lack of expression (data not shown). The fact that no *ALT2* expression was detected under the tested conditions suggests that evolution of the *cis*-acting elements present in the promoter of this gene has led to complete *ALT2* repression. Global transcription studies have shown that *ALT2* expression could be induced under stressful conditions (Gasch et al. 2000), and that it is determined by chromatin remodeling factors (Sudarsanam et al. 2000), thus, the Alt2p role could be confined to peculiar physiological conditions, as has been shown for the *GDH3* paralogue, whose expression is highly repressed and is only induced under respiratory conditions (DeLuna et al. 2001; Avendano et al. 2005).

Concluding remarks

To our knowledge, Alt1p constitutes the first alanine aminotransferase that simultaneously displays biosynthetic and catabolic capacities. Thus, specialization of *ALT1* provides a unique pathway for alanine metabolism under respiratory conditions. It can be considered that the concerted action of the glutamine-aminotransferase- ω -amidase pathway and Alt1p has facilitated respiratory metabolism, determining alanine biosynthesis and catabolism, providing, in addition, a system leading to equilibrated utilization and biosynthesis of pyruvate. It is also relevant that the pathways here involved, namely the catabolic and anabolic use of alanine, are key to both the central nitrogen and carbon metabolic networks. Pyruvate constitutes an intersection in the network

of metabolic pathways, since it can be converted to carbohydrates via gluconeogenesis, to fatty acids or energy through acetyl-CoA and to ethanol, uniting several central metabolic processes, and thus its metabolism should be highly controlled. Worth mentioning is the fact that genomes of hemiascomycetes, which diverged from *S. cerevisiae* prior or after genome duplication, have conserved *ALT1*, highlighting the fact that Alt1p plays a central role in alanine metabolism (Blank et al. 2005).

Acknowledgements

The authors are grateful to L. Ongay, G. Codiz, and M. Sosa (Unidad de biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)) for DNA sequencing and synthesis of oligonucleotides; to C. Aranda for technical assistance; and to A. DeLuna and M. Soberón for critical discussions. This work was supported in part by the Dirección de Asuntos del Personal Académico, UNAM grant IN210706-3, by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 49970 and by the Macroproyecto de Tecnologías de la Información y La Computación UNAM. F.G.C. was the recipient of a fellowship from the Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) UNAM.

References

Avendano, A., Riego, L., DeLuna, A., Aranda, C., Romero, G., Ishida, C., et al. 2005. Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **57**: 291–305. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04689.x. PMID:15948967.

Blank, L.M., Lehmbeck, F., and Sauer, U. 2005. Metabolic flux and network analysis of fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* **5**: 545–558. doi:10.1016/j.femsyr.2004.09.008. PMID:15780654.

Calderon, J., Morett, E., and Mora, J. 1985. ω -Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **161**(2): 807–809. PMID:2857167.

Chico, E., Olavarria, J.S., and Nunez de Castro, I. 1978. L-Alanine as an end product of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under different hypoxic conditions. *Antonie Leeuwenhoek*, **44**(2): 193–201. doi:10.1007/BF00643222. PMID:375832.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**(1): 119–122. doi:10.1016/0378-1119(92)90454-W. PMID:1544568.

Cooper, A.J., and Meister, A. 1977. The glutamine transaminase- ω -amidase pathway. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**(3): 281–303. doi:10.3109/10409237709102560. PMID:319948.

de Sousa, C.A.F., and Sodek, L. 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferases activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environ. Exp. Bot.* **50**: 1–8. doi:10.1016/S0098-8472(02)00108-9.

DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* **276**(47): 43775–43783. doi:10.1074/jbc.M107986200. PMID:11562373.

Duran, S., Du Pont, G., Huerta-Zepeda, A., and Calderon, J. 1995. The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. *Microbiology*, **141**(Pt 11): 2883–2889. PMID:8535516.

Feng, Z., Caceres, N.E., Sarath, G., and Barletta, R.G. 2002. *Mycobacterium smegmatis* L-alanine dehydrogenase (Ald) is required for proficient utilization of alanine as a sole nitrogen source and sustained anaerobic growth. *J. Bacteriol.* **184**(18): 5001–5010. doi:10.1128/JB.184.18.5001-5010.2002. PMID:12193615.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., et al. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **11**(12): 4241–4257. PMID:11102521.

Gatehouse, P.W., Hopper, S., Schatz, L., and Segal, H.L. 1967. Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **242**(10): 2319–2324. PMID:4961051.

Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**(14): 1541–1553. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K. PMID:10514571.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265–275. PMID:14907713.

McCowen, S.M., and Phibbs, P.V., Jr. 1974. Regulation of alanine dehydrogenase in *Bacillus (licheniformis)*. *J. Bacteriol.* **118**(2): 590–597. PMID:4151305.

Quezada, H., Aranda, C., Deluna, A., Hernandez, H., Calcagno, M.L., Marin-Hernandez, A., and Gonzalez, A. 2008. Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **154**(Pt 6): 1656–1667. doi:10.1099/mic.0.2008/017103-0. PMID:18524920.

Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* **5**(7): 1543–1554. doi:10.1021/pr050477f. PMID:16823961.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Segal, H.L., and Matsuzawa, T. 1970. L-Alanine aminotransferase (rat liver). In *Methods in enzymology*. Academic Press, New York. pp. 153–159.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**(1): 19–27. PMID:2659436.

Soberon, M., and Gonzalez, A. 1987. Glutamine degradation through the omega-amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**(1): 9–14. PMID:3309146.

Soberon, M., Olamendi, J., Rodriguez, L., and Gonzalez, A. 1989. Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **135**(10): 2693–2697. PMID:2698914.

Struhl, K., and Davis, R.W. 1981. Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **152**(3): 535–552. doi:10.1016/0022-2836(81)90267-9. PMID:6173489.

Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O., and Winston, F. 2000. Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(7): 3364–3369. doi:10.1073/pnas.050407197. PMID:10725359.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**(9): 4350–4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350. PMID:388439.

Umemura, I., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Sato, T., and Tosa, T. 1994. Purification and some properties of alanine aminotrans-

- ferase from *Candida maltosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**(2): 283–287. PMID:7764540.
- Valenzuela, L., Aranda, C., and Gonzalez, A. 2001. TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* **183**(7): 2331–2334. doi:10.1128/JB.183.7.2331-2334.2001. PMID:11244074.
- Wang, N.C., and Lee, C.Y. 2006. Molecular cloning of the aspartate 4-decarboxylase gene from *Pseudomonas* sp. ATCC 19121 and characterization of the bifunctional recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**(2): 339–348. doi:10.1007/s00253-006-0475-6. PMID:16847601.
- Wang, M.D., Buckley, L., and Berg, C.M. 1987. Cloning of genes that suppress an *Escherichia coli* K-12 alanine auxotroph when present in multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* **169**(12): 5610–5614. PMID:2890623.