



112 81
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DE LAS SUBUNIDADES ALFA DE PROTEINAS G
DE LA LEVADURA *Kluyveromyces Lactis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

ING. ALMA LETICIA SAVINON TEJEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

MEXICO, D. F.

2000

1967



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 302 oriente del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega.

Agradecimientos

A mi papá, mi mamá y mis hermanos (¡incluyendo a Dani!), por aguantarme y creer siempre en mí.

Al Instituto Politécnico Nacional y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por toda mi formación académica y profesional.

Al Dr. Roberto Coria Ortega, por la oportunidad y el apoyo que me dio para poder alcanzar mi meta.

A la Dra. Imelda López Villaseñor y al Dr. Fernando López Casillas, miembros de mi comité tutorial, por las críticas y las aportaciones a mi trabajo.

A los miembros del jurado, por la disponibilidad que mostraron para la revisión de mi tesis.

A Laura Ongay, Jorge Ramírez y Anaid Antaramián, por todas sus enseñanzas y consejos.

A mis compañeros de laboratorio (¡los que me aguantaron por mas tiempo!): Marichuy, Alex, Julián, Paty, Yasmín, Carlos, Sol, Mary, Marce y Bernardo, por la convivencia diaria.

A Vicente, Lupita y Simón, los mejores amigos que he tenido en los últimos 5 años. Mil gracias por su cariño incondicional y por los muchos, muchos buenos momentos.

A René y Adriana, porque llegaron en los peores momentos y me han brindado su apoyo y amistad sincera.

A TODOS, absolutamente TODOS mis amigos, porque sin ellos hubiera llegado a ninguna parte.

A la vida, por lo mucho que me ha dado.

*Este trabajo se lo dedico con
todo mi cariño a:*

*Mi papá y mi mamá
Leonardo y Rosa María*

*Mis hermanos
Rosalba y Octavio*

*Mis amigos
Vicente y Lupita*

Indice

Resumen

Abstract

I. Introducción

I.1 Mecanismo de acción de las proteínas G

I.2 Estructura de las proteínas G

I.2.1 La subunidad α

I.2.2 El dímero $\beta\gamma$

I.3 Proteínas G en *Saccharomyces cerevisiae*

I.3.1 El sistema de respuesta a feromonas de apareamiento

I.3.2 Diferenciación pseudohifal

I.4 Proteínas G en el reino fungi

I.5 *Kluyveromyces lactis*: un modelo alternativo

II. Antecedentes del proyecto

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

III.2 Objetivos Particulares

IV. Resultados

III.1 Artículo: The *KlGpal* gene encodes a G protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*

III.2 Ensayos de interacción

V. Discusión general

VI. Perspectivas

VII. Anexo A. Artículo: Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*.

Anexo B. Metodologías

VIII. Bibliografía

Resumen

Los sistemas de transducción de señales mediados por proteínas G heterotriméricas están presentes en todos los organismos eucariontes, desde protistas hasta mamíferos. En el ascomiceto *Kluyveromyces lactis* hemos identificado dos genes que codifican para subunidades alfa de proteína G, los cuales hemos denominado *KIGPA1* y *KIGPA2*. Mutantes que no expresan *KIGPA2* mostraron una disminución en el nivel basal intracelular de AMP cíclico, y la concentración de este segundo mensajero en las mutantes no aumentó como respuesta a un estímulo por glucosa. Por otra parte, mutantes que no expresan *KIGPA1* son viables y con baja capacidad de apareamiento. La doble mutante $\Delta KIGpa1$, $\Delta KIGpa2$ también es viable y prácticamente estéril. La capacidad para aparearse de una cepa silvestre se redujo tanto por la sobre expresión de *KIGPA2* como por la expresión de una mutante constitutivamente activa de *KIGPA1*. Esta última no restableció la respuesta de la $\Delta KIGpa1$. Con base en estos resultados, hemos formulado un modelo en el cual, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, KIGpa1p es el elemento transductor de la cascada de señales en respuesta a feromonas de apareamiento, mientras que KIGpa2p está involucrada en la regulación de la enzima adenilato ciclasa, aunque es capaz de intervenir en la vía de respuesta a feromonas. Lo anterior sugiere una relación entre la regulación del AMP cíclico y el proceso de apareamiento, de manera similar a lo que ocurre en otras especies de levadura.

Abstract

From protists to mammals, signal transduction pathways involving heterotrimeric G proteins are present in all kind of eucariotic organisms. In the ascomycetous *Kluyveromyces lactis* we have identified two G protein alpha subunit genes, *KIGPA1* y *KIGPA2*. Mutants lacking *KIGPA2* showed significant reduced basal levels of intracellular cAMP, and the production of this second messenger in the mutants was not glucose-stimulated. On the other side, mutants lacking *KIGPA1* are viables and with low mating ability. The doble mutant $\Delta KIGpa1$, $\Delta KIGpa2$ is also viable and sterile. In addition, mating ability of a wild type cell is reduced both by overexpression of *KIGPA2* and by expression of a constitutive active mutant of *KIGPA1*. However, expression of active KIGpa1p is unable to restore mating competence of $\Delta KIGpa1$ mutant. We have proposed a model for *K. lactis* where, unlike *S. cerevisiae* Gpa1p, KIGpa1p is a positive element of the pheromone response pathway, and KIGpa2p is involved in the regulation of the enzyme adenylyl cyclase, but also participate, in some way, in the pheromone response. These results suggest a relationship between cAMP regulation and mating pathways, as it occurs in other yeasts.

I. Introducción

Toda célula eucarionte responde a una amplia variedad de señales que provienen del exterior a fin de regular su crecimiento, desarrollo y organización con las células vecinas. Estas señales utilizan diferentes mecanismos para inducir su acción en el interior de la célula; algunas, como las hormonas esteroides, simplemente se mueven a través de la membrana para encontrar sus moléculas blanco. Sin embargo, muchos de los procesos de transducción de señales son mas complicados que eso: después de que el estímulo es recibido por un receptor en la superficie de la célula, una señal diferente se desprende hacia el interior desencadenando una vía de señalización. A finales de los años 50, Sutherland y colaboradores describieron el papel de los sistemas de membrana en la conversión de dichas señales extracelulares en cambios metabólicos por medio de la producción de segundos mensajeros intracelulares (Rall *et al*; 1956). En 1971, Rodbell demostró que la activación de la enzima adenilato ciclasa requería de la presencia de GTP, por lo que postuló que el intermediario entre el receptor de la hormona glucagon y la enzima debía ser una proteína que uniera nucleótidos de guanidina (Rodbell *et al*; 1971). A partir de estos y otros estudios Rodbell propuso que este sistema de transducción de señales constaba de un receptor, que unía específicamente al ligando, un transductor y un efector. En 1977, Ross y Gilman probaron esta teoría al demostrar que la comunicación entre el receptor y la enzima adenilato ciclasa se rompía cuando la célula carecía de una proteína que unía GTP, la cual denominaron simplemente proteína G (guanine nucleotide-binding protein) (Ross *et al*; 1977). Dedujeron así que la epinefrina conducía a la producción de AMP cíclico, pasando la información a través del receptor a la proteína G la cual, cuando estaba unida a GTP, podía estimular a la enzima adenilato ciclasa (Linder y Gilman, 1992).

A lo largo de los últimos veinte años, el conocimiento acerca de la estructura, función y diversidad de las proteínas G ha ido en aumento de manera exponencial. Las proteínas G forman una subdivisión de la superfamilia de proteínas que unen nucleótidos de guanidina (GDP, GTP) con gran afinidad y especificidad. Este grupo de proteínas incluye factores de elongación (EFTu), el oncogene *ras*, y la familia de pequeñas GTPasas relacionadas con *ras*, tales como *rab*, *rac*, *ral*, etc. (Bourne *et al*, 1990). Las proteínas G que participan en la transducción de señales a través de membrana son heterotrímeros compuestos por una subunidad α , una subunidad β y una subunidad γ . Las cadenas β y γ están fuerte, pero no covalentemente unidas en un heterodímero que funciona como una sola subunidad que puede ser compartida por diferentes cadenas, mientras que la subunidad α es diferente para cada heterotrímero. Las proteínas G se encuentran fuertemente unidas a la cara citoplasmática de la bicapa lipídica y se comportan como proteínas integrales de membrana. Su función central es propagar la acción de diferentes compuestos extracelulares, incluyendo hormonas, neurotransmisores, neuromoduladores, factores autócrinos y parácrinos, hacia el interior de la célula. Se han encontrado cientos de receptores que transmiten sus mensajes a través de este tipo de proteínas, por lo que su papel es diverso en el funcionamiento de la célula.

I.1 Mecanismo de acción de las proteínas G

Las proteínas G llevan a cabo su función por medio de ciclos de activación/desactivación (Birnbaumer y Iyengar, 1990; Neer, 1994) (figura 1). En el estado inactivo las cadenas α , β y γ forman un complejo con GDP unido a la subunidad α . En este estado la proteína G es capaz de asociarse a un receptor de siete segmentos transmembranales o tipo TM-7 (aunque la subunidad α libre de $\beta\gamma$ puede unirse al receptor, la presencia del dímero aumenta su afinidad por éste).

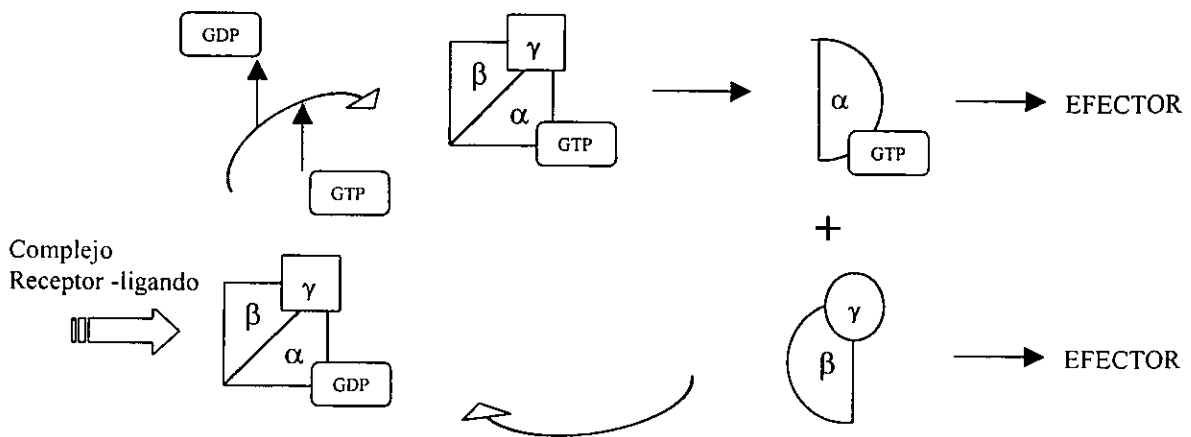


Figura 1. Ciclo de regulación de las proteínas G

Cuando un agonista activa al receptor, éste sufre un cambio conformacional que transmite a la subunidad α , estimulando la salida de GDP y facilitando la unión de GTP. Este cambio de nucleótido se favorece porque la afinidad de la subunidad α por el GTP es mayor que por el GDP, y porque la concentración del primero en las células es mayor (Neer, 1994). La subunidad α con GTP unido adquiere su conformación activa, se disocia del dímero $\beta\gamma$ y posteriormente del receptor, siendo capaz ahora de unirse y regular una amplia variedad de efectores, como las enzimas adenilato ciclasa, fosfodiesterasa (PDE) y fosfolipasa C (PLC), y canales de Ca^{2+} y K^+ (DeVivo y Iyengar, 1994). Originalmente se pensó que únicamente la subunidad α era capaz de interactuar con efectores, y que el papel de $\beta\gamma$ era la regulación negativa; ahora se sabe que no sólo el dímero es capaz de desencadenar señales, sino que también algunas vías son incluso reguladas por ambas subunidades (Tabla I) (Knall y Johnson, 1998).

La capacidad intrínseca de la subunidad α para hidrolizar al GTP es el mecanismo de apagado de las proteínas G. Poco tiempo después de su activación, la subunidad α convierte el GTP en GDP volviendo a su estado inactivo, el cual tiene mayor afinidad por el dímero $\beta\gamma$. Todas las isoformas conocidas de α hidrolizan al GTP, aunque la velocidad de hidrólisis varía de un tipo a otro. El carácter irreversible de la hidrólisis del GTP hace al ciclo de las proteínas G unidireccional: la reactivación del sistema requiere que el heterotrímero vuelva a unirse al receptor activado, lo cual significa que, en contraste con la regulación alostérica, la velocidad de inactivación de la proteína G la determina la hidrólisis de GTP y no la disociación del ligando que desencadena la señal (Heideman y Bourne, 1990). Es interesante notar que la velocidad de hidrólisis del GTP determina el tiempo de activación tanto de α como de $\beta\gamma$, pues la formación del heterotrímero detiene la acción de ambas subunidades. El tiempo que permanece un efector activado es el tiempo que permanece la subunidad α unida a GTP; este periodo de tiempo depende de la K_{cat} de la actividad de GTPasa (la cual es de $1-4 \text{ min}^{-1}$).

Tabla I. Efectores de proteínas G heterotriméricas.

<i>Subunidad</i>	<i>Efector</i>
G α s	Todos los tipos de adenilato ciclasa Canales de Ca ²⁺ sensibles a voltaje
G α i	Adenilato ciclasa tipos 5 y 6 Canales de K ⁺ cGMP fosfodiesterasa
G α q	Fosfolipasa C β (PLC β) Cinasa de proteínas C (PKC) Cinasa de tirosina de Bruton (BTK)
G $\beta\gamma$	PLC β Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) Adenilato ciclasa tipos 1, 2, 4 y 7 Cinasa de receptor β -adrenérgico Fosfoducina Canales de K ⁺ , Ca ²⁺ y Na ⁺ Miembros de la familia Rho

Una característica importante de las proteínas G es su propiedad para conferir direccionalidad y amplificación a las señales. La direccionalidad, como se mencionó anteriormente, se debe a la hidrólisis irreversible del GTP. La amplificación se genera ya sea por la activación de diferentes proteínas G a través de la activación de un solo receptor, o bien porque una sola proteína G es capaz de producir una gran cantidad de segundos mensajeros durante su estado activo (Heideman y Bourne, 1990).

I.2 Estructura de las proteínas G

I.2.1 La subunidad α

A la fecha se han identificado unas 21 subunidades α de mamífero (17 genes y algunas isoformas), agrupadas en cuatro familias con base en el grado de identidad entre sus secuencias de aminoácidos (figura 2). Esta clasificación refleja la divergencia evolutiva entre estas proteínas, que varía entre un 40% de identidad para las subunidades menos relacionadas, hasta un 94% entre los miembros de una misma familia. Con excepción de α_{16} , estas proteínas se encuentran muy conservadas entre diferentes especies de mamíferos (> 95%) y se han identificado homólogos altamente conservados de estos genes en invertebrados, plantas y organismos eucariontes inferiores (Simon *et al*, 1991).

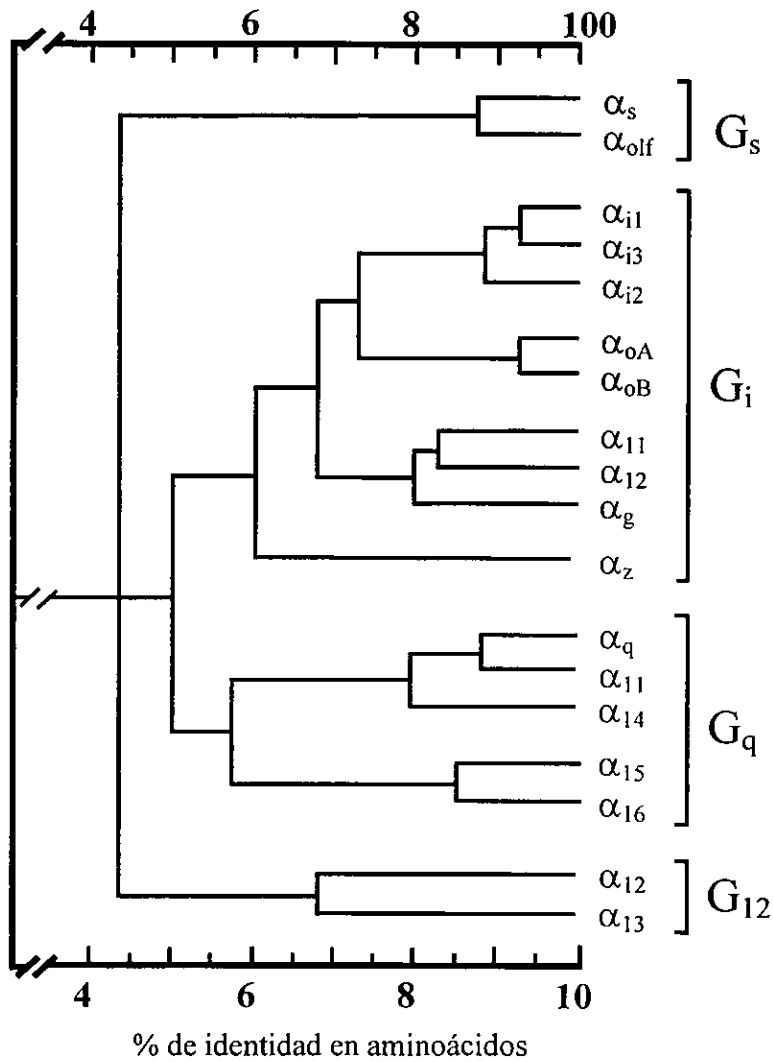


Figura 2. Clasificación de las subunidades G α de mamífero con base en el grado de identidad entre sus secuencias de aminoácidos (Hepler y Gilman, 1992).

Las subunidades α también pueden agruparse con base en la modificación causada por toxinas bacterianas (tabla II). La toxina del cólera (CTX) cataliza la transferencia de la molécula de ADP-ribosa del NAD a un residuo específico de arginina. De manera similar, la toxina pertussis (PTX) ADP-ribosila las subunidades que poseen un residuo específico de cisteína cercano al extremo carboxilo terminal (West *et al.*, 1985). La modificación causada por la toxina del cólera activa constitutivamente a la subunidad α , inhibiendo la actividad de hidrólisis del GTP (Hepler y Gilman, 1992), mientras que la toxina pertussis previene la asociación con el receptor. Los miembros de la familia G α_s son modificados por toxina del cólera, mientras que todos los miembros de la familia G α_i , excepto α_z , pueden ser modificados por la toxina pertussis. (Hepler y Gilman, 1992; Neer, 1994).

Tabla II. Propiedades de subunidades G α

Familia Subunidad	Masa (kDa x 10 ³)	% Identidad aminoácidos	Sensibilidad a toxina
Gs			
$\alpha_{S(S)}$	44.2	100	CTX
$\alpha_{S(L)}$	45.7	-	CTX
α_{Of}	44.7	88	CTX
Gi			
α_{i1}	40.3	100	PTX
α_{i2}	40.5	88	PTX
α_{i3}	40.5	94	PTX
α_{OA}	40.0	73	PTX
α_{OB}	40.1	73	PTX
α_{t1}	40.0	68	CTX, PTX
α_{t2}	40.1	68	CTX, PTX
α_g	40.5	67	CTX (?) PTX
α_z	40.9	60	
Gq			
α_q	42.0	100	
α_{11}	42.0	88	
α_{14}	41.5	79	
α_{15}	43.0	57	
α_{16}	43.5	58	
G _{12,13}			
α_{12}	44.0	100	
α_{13}	44.0	67	

*Hepler y Gilman, 1992

Algunas subunidades α (el grupo Go y algunas del tipo Gi) sufren modificación postraduccional por adición de ácido mirístico. Este ácido graso de 14 carbonos se une de manera irreversible a una glicina del extremo amino terminal, después de que se ha eliminado la metionina inicial; aunque no existe una secuencia consenso absoluta para la unión de este compuesto, la glicina en posición 2, inmediatamente después de la metionina, es esencial y se prefiere un hidroxiaminoácido (típicamente serina) en la posición 6 (Spiegel *et al*, 1991). La unión del ácido mirístico a la subunidad α aumenta su afinidad por $\beta\gamma$ y es esencial para su asociación con la membrana; el cambio de la glicina del amino terminal por alanina previene la miristoilación y mueve a la subunidad α al citosol (Jones *et al*, 1990). Puesto que otras subunidades α (como α_s) no unen ácido mirístico, se cree que existen otros mecanismos de unión a la membrana.

Otras subunidades α (α_o , $\alpha_{i\ 1-3}$, α_z , α_q) unen ácido palmítico. Esta modificación ocurre de manera reversible en una cisteína cercana al extremo amino terminal (Linder *et al*, 1993). El papel de la adición de este ácido de 16 carbonos no está muy claro. En contraste con la miristoilación, la palmitoilación ocurre en la membrana, lo que significa que la subunidad α debe estar unida a ésta previo a la modificación. Sin embargo, las subunidades α incapaces de unir ácido palmítico se han encontrado mayoritariamente en la fracción soluble, por lo que se cree que la palmitoilación debe ser el mecanismo que permite a la subunidad α permanecer unida a membrana (Wedegaertner *et al*, 1993).

La resolución de la estructura cristalina de la subunidad $G\alpha_i$ ha permitido aclarar las bases estructurales para la función de esta proteína (Noel *et al*, 1993, figura 3). La estructura muestra alta homología con las estructuras de p21ras y EFTu, las cuales habían sido utilizadas anteriormente como modelos. La subunidad α consta de dos dominios, el primero denominado de GTPasa, estructura conservada en todas las proteínas que hidrolizan GTP, y el segundo denominado dominio helicoidal, únicamente presente en las subunidades α de proteínas G heterotriméricas y cuya función no ha sido totalmente esclarecida (Rens-Domiano y Hamm, 1995); el nucleótido de guanina se une en una cavidad formada por ambos dominios. El extremo amino terminal (aproximadamente los primeros 25 aminoácidos) es esencial para la unión con $\beta\gamma$; la superficie de la subunidad α que hace contacto con el dímero es diferente en los estados activo e inactivo, lo cual concuerda con el hecho de que la unión de $\beta\gamma$ depende de manera crítica del nucleótido que esté unido a α (Neer, 1995). Tanto el extremo carboxilo terminal como la hélice α_5 son sitios importantes de interacción con el receptor; el extremo carboxilo también tiene un papel importante en la especificidad de la interacción (Conklin y Bourne, 1993), aunque la secuencia de este extremo no es la única determinante en la unión específica de α con su receptor, puesto que algunas subunidades poseen extremos carboxilo idénticos y unen diferentes receptores (Neer, 1995; figura 4). La estructura de α_{GDP} es muy similar a la de α_{GTP} , siendo las regiones denominadas Switch I, II y III las que sufren mayores cambios por el cambio de nucleótido (figuras 3 y 4). Las regiones I y II tienen sus contrapartes en Ras y EF-Tu, mientras que la región III sólo existe en las proteínas G heterotriméricas, y los cambios en esta región parecen ocurrir como una respuesta secundaria a los cambios ocurridos en la región II (Lambright *et al*, 1994).

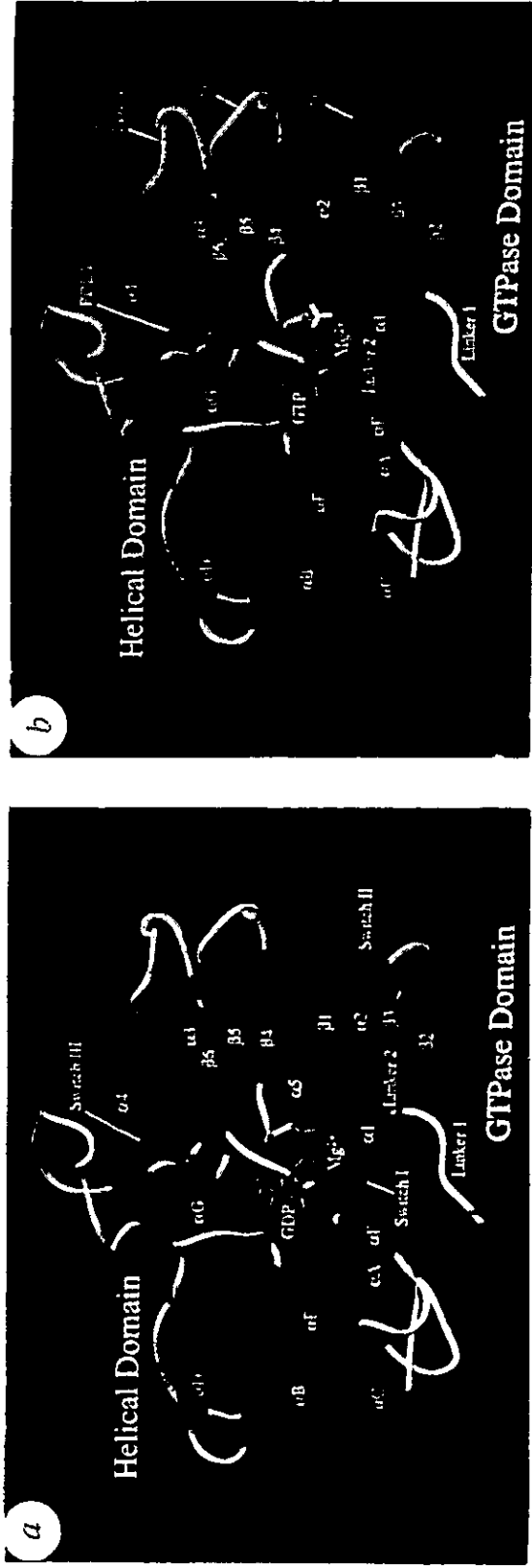


Figura 3. Esquema de la estructura del cristal de la subunidad α transducina (G α). (a) Forma inactiva G α -GDP, (b) forma activa G α -GTP γ S. Las regiones Switch I, II y III se muestran en azul y GDP (o GTP γ S) en morado. (Lammbright, 1994)

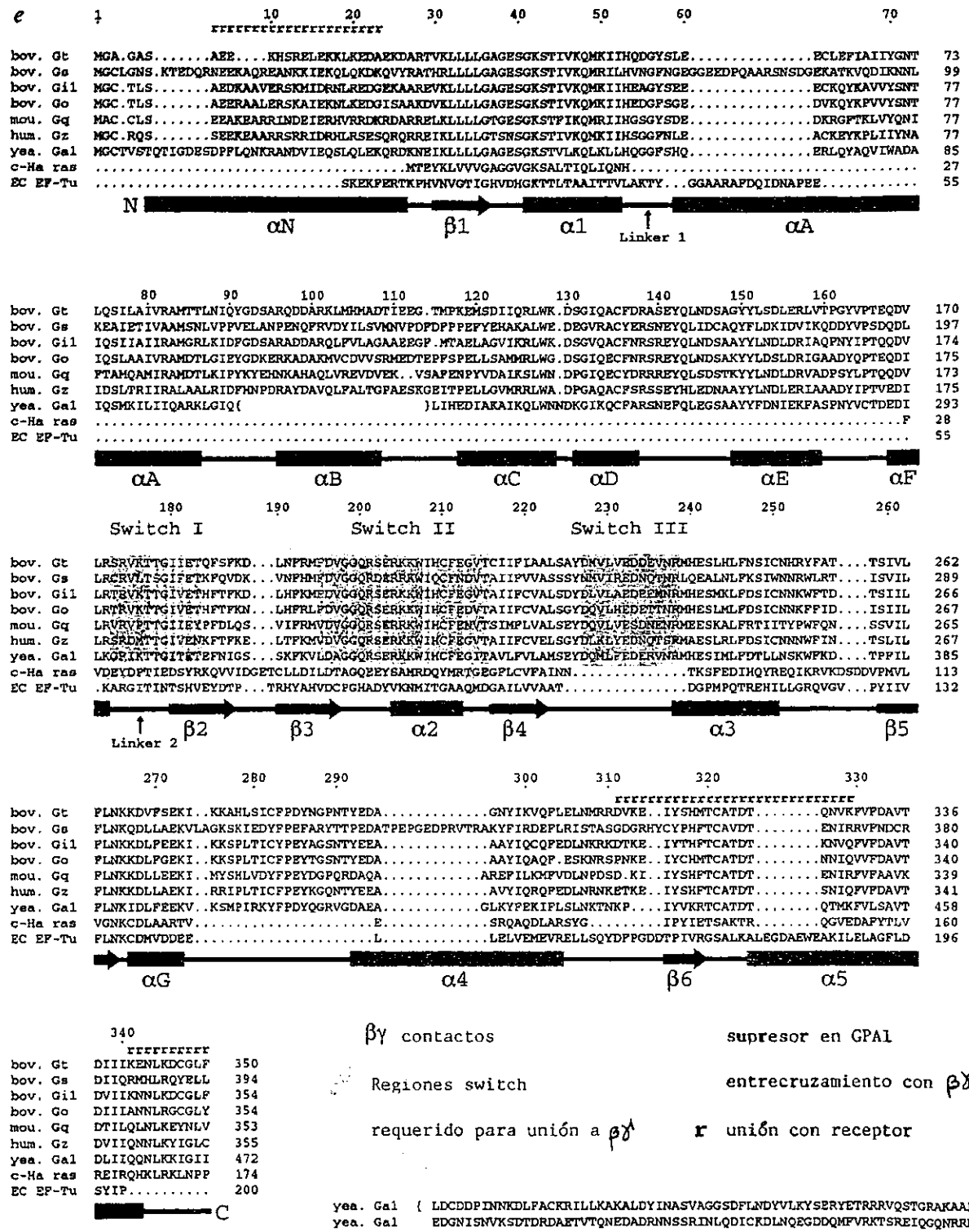


Figura 4. Alineamiento de secuencias de subunidades Gα: debajo del alineamiento se muestra la estructura secundaria correspondiente a Gαiα (Lambright, 379).

I.2.2 El dímero $\beta\gamma$

A la fecha se conocen cinco diferentes subunidades β que comparten entre el 50 y 90% de identidad en su secuencia de aminoácidos. La subunidad β se caracteriza por estar dividida en ocho segmentos de 40 aminoácidos, cada uno de los cuales contiene un par triptofano-aspartico, conocido como el motivo WD-40, presente en las proteínas involucradas en transducción de señales, regulación de la división celular, transcripción y formación del citoesqueleto, entre otras funciones (Neer; 1995). En contraste, las seis subunidades γ conocidas son muy diferentes entre sí. La subunidad γ posee en el extremo carboxilo terminal un dominio CAAX (donde C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido sin carga), conocido como una secuencia consenso para modificación postraducciona, y en el caso de γ lo que se une a la cisteína de este dominio es un grupo isoprenilo, el cual es diferente para cada una de las subunidades conocidas. La isoprenilación de γ no es necesaria para la formación del dímero, pero sí lo es para su anclaje a membrana y, en algunos casos, para su asociación con α (Neer; 1995).

Las subunidades β y γ se unen entre sí para formar un complejo que funciona como una sola entidad que es considerada una proteína integral de la membrana porque se requiere del uso de detergentes para su solubilización, sin que la unión sea covalente y no hay enlaces disulfuro entre ellas (Simonds; 1994). Las 5 subunidades β y las 6 γ podrían producir 30 combinaciones diferentes del dímero, pero no todas las combinaciones son posibles debido a la expresión diferencial de las subunidades en ciertos tejidos o durante el desarrollo, y a características estructurales intrínsecas (Simonds; 1994). La estructura tridimensional del dímero $\beta\gamma$ fue resuelta primero con la cristalización del heterotrímero $G_{\alpha 1}\beta_1\gamma_2$ (Wall *et al*; 1995, figura 5), y después con la cristalización del dímero $G_{\beta\gamma}$ (Sondek *et al*, 1996). El complejo de las tres subunidades muestra una estructura altamente asimétrica en la cual la subunidad γ está embebida en β , la cual a su vez forma extensos contactos localizados con α . El núcleo de la subunidad β se pliega formando una propela toroidal compuesta de siete hojas β , las cuales forman un canal central. El extremo carboxilo de γ (modificado por unión de lípidos isoprenoides *in vivo*) y el extremo amino de α (modificado por unión de ácidos grasos *in vivo*) están orientados hacia la cara "ancha" de la propela (figura 5). En contraste con la reorganización estructural que sufre la subunidad α , no se han observado cambios de conformación significativos en el dímero $\beta\gamma$ (Lambright *et al*, 1996).

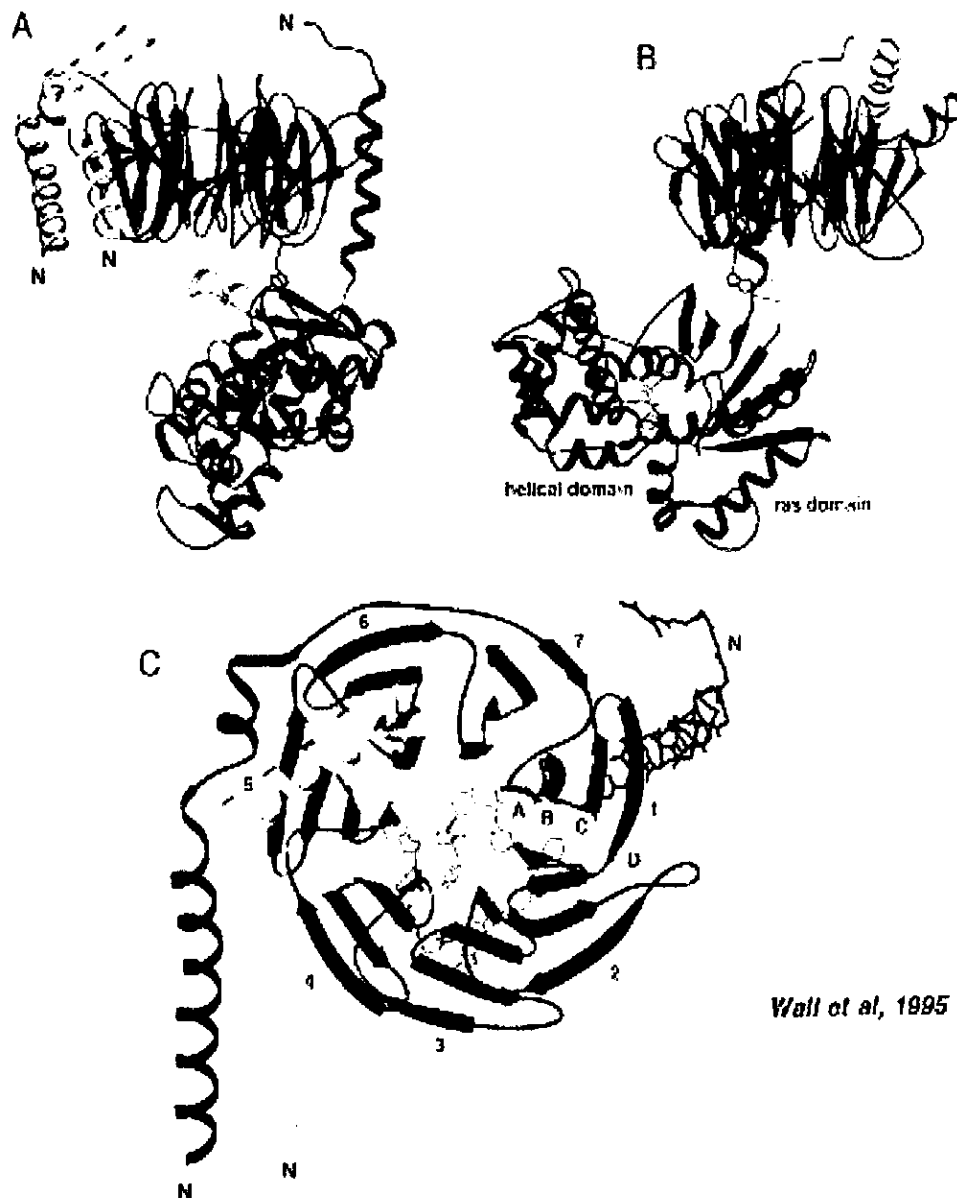


Figura 5. Tres vistas del heterotrímero $G_{i\alpha 1}(GDP)\beta_1\gamma_2$. La subunidad α_1 se muestra en azul (GDP en rojo), β_1 en verde y γ_2 en amarillo.

1.3 Proteínas G en *Saccharomyces cerevisiae*

En los últimos años se ha identificado un gran número de receptores, proteínas G y efectores de células de mamífero, aunque en pocos casos se conocen todos los componentes de la vía en la que están involucrados, ya que los procesos de transducción en organismos superiores son complejos y sus componentes muy diversos. La presencia de proteínas G en todos los organismos eucariontes (desde protozoarios hasta mamíferos) sugiere que estas proteínas provienen de un ancestro común y que sus funciones se han conservado a través de la evolución, lo que se ha convertido en una gran ventaja pues ha permitido utilizar modelos más simples para entender los mecanismos fundamentales de la acción y regulación de las proteínas G. Uno de estos modelos es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee características que la hacen un organismo apropiado para el estudio de estos sistemas ya que los componentes de sus sistemas de transducción son muy similares a los de organismos superiores, tanto en estructura como en función, y existe una gran facilidad para caracterizar genética y molecularmente los procesos de señalización, siendo la propiedad de crecer como haploide particularmente útil para caracterizar mutaciones recesivas, lo cual facilita la identificación y caracterización de nuevas proteínas pertenecientes a esta clase de sistemas (Dohlman *et al*, 1998).

Gracias a que el genoma de *S. cerevisiae* ha sido completamente secuenciado (Goffeau, 1996) ahora se sabe que este organismo posee únicamente dos genes $G\alpha$: *GPA1* (o *SCG1*), cuyo producto está implicado en la respuesta a feromonas de apareamiento (Miyajima *et al*, 1987; Dietzel y Kurjan, 1987), y *GPA2*, que participa en la diferenciación pseudohifal a través de la regulación de los niveles de AMP cíclico (Kübler *et al*, 1997; Lorenz y Heitman, 1997).

1.3.1 El sistema de respuesta a feromonas de apareamiento

El proceso de respuesta a feromonas, que conduce al apareamiento y finalmente a la formación de diploides, es una vía regulada por una proteína G heterotrimérica. Los productos de los genes *GPA1* (o *SCG1*), *STE4* y *STE18* son los homólogos de las subunidades α , β y γ de las proteínas G del mamífero (Nakafuku *et al*, 1987; Dietzel y Kurjan, 1987; Whiteway *et al*, 1989). El gen de la subunidad α fue identificado por dos grupos diferentes a través de la hibridación con una sonda de $G\alpha_i$ de rata (Nakafuku *et al*, 1987) y por un proceso de selección de genes cuya sobre expresión confiere resistencia a feromonas (Dietzel y Kurjan, 1987). Mutantes haploides $\Delta gpa1$ muestran defectos en crecimiento y anormalidades morfológicas (Dietzel y Kurjan, 1987; Miyajima *et al*, 1987) causados por la activación constitutiva del sistema en ausencia de feromona. Esto indica que *Gpa1p* inhibe la respuesta a la feromona, esto es, participa como regulador negativo (Kurjan, 1993; Kurjan 1992). Por otro lado, las mutantes $\Delta ste4$ o $\Delta ste18$ son incapaces de responder al estímulo de la feromona, lo cual conduce a la esterilidad, y suprimen el fenotipo de la mutación $\Delta gpa1$, lo que indica un papel positivo del dímero en el sistema (Kurjan, 1992; Kurjan, 1993). Con base en estos resultados iniciales se planteó un modelo sobre el mecanismo de regulación del sistema de respuesta a feromonas, el cual ahora es una de las vías mejor conocidas en la levadura como se detalla a continuación.

La figura 6 ilustra el ciclo sexual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo en su estado haploide existe en dos tipos celulares denominados a y α , indistinguibles morfológicamente y que difieren únicamente en un locus (denominado mating type locus, *MAT*), que codifica

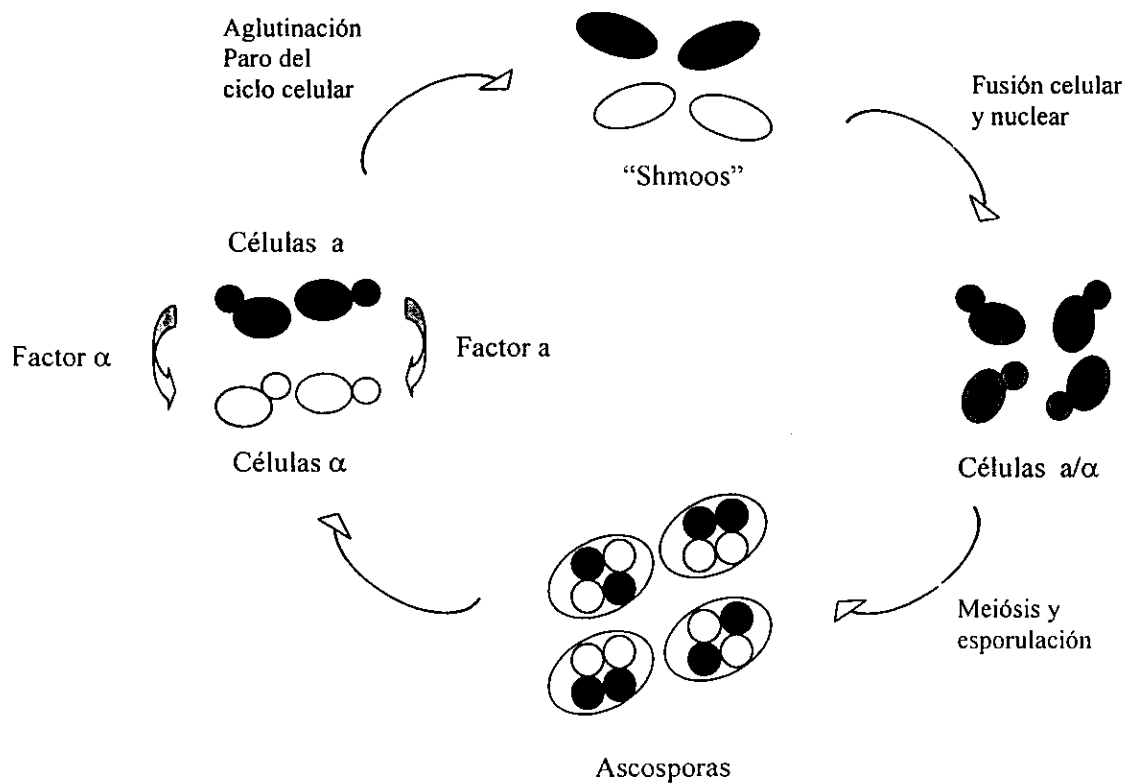


Figura 6. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*

reguladores transcripcionales que controlan la expresión de los genes específicos para cada tipo celular. Las células haploides proliferan por división mitótica, pero tienen el potencial de aparearse entre ellas y formar un tercer tipo celular diploide a/α , el cual, bajo condiciones de limitación de nutrientes, lleva a cabo un ciclo meiótico que conduce a la esporulación y formación de cuatro células haploides, dos del tipo a y dos del α (Herskowitz, 1988).

Para que las células vegetativas haploides sean capaces de aparearse deben sufrir un proceso de diferenciación específica. Los dos tipos celulares haploides (a y α) secretan un pequeño péptido (feromona a y feromona α , respectivamente) que actúa sobre la célula del tipo opuesto para promover la conjugación. Las feromonas a y α se unen a receptores de la membrana del tipo de siete dominios transmembranales (codificados por los genes *STE3* y *STE2*, respectivamente) (figura 7). Aunque cada tipo celular secreta una feromona única y expresa un receptor específico para responder a la feromona de la célula del tipo opuesto, los componentes intracelulares de la vía de transducción de señales desencadenada por la formación del complejo receptor-ligando son comunes para ambos tipos haploides. La unión de la feromona a su receptor activa a la proteína G, promoviendo en la subunidad G β 1 (o Scg1) el cambio de GDP por GTP y su disociación del dímero $\beta\gamma$ (Ste4/Ste18), siendo este último el responsable de propagar la señal a través de una cascada de cinasas (Nomoto *et al*, 1990). Esta cascada conduce a una serie de cambios celulares, de morfología (formación de células alargadas en forma de pera denominadas "shmoos"), interrupción

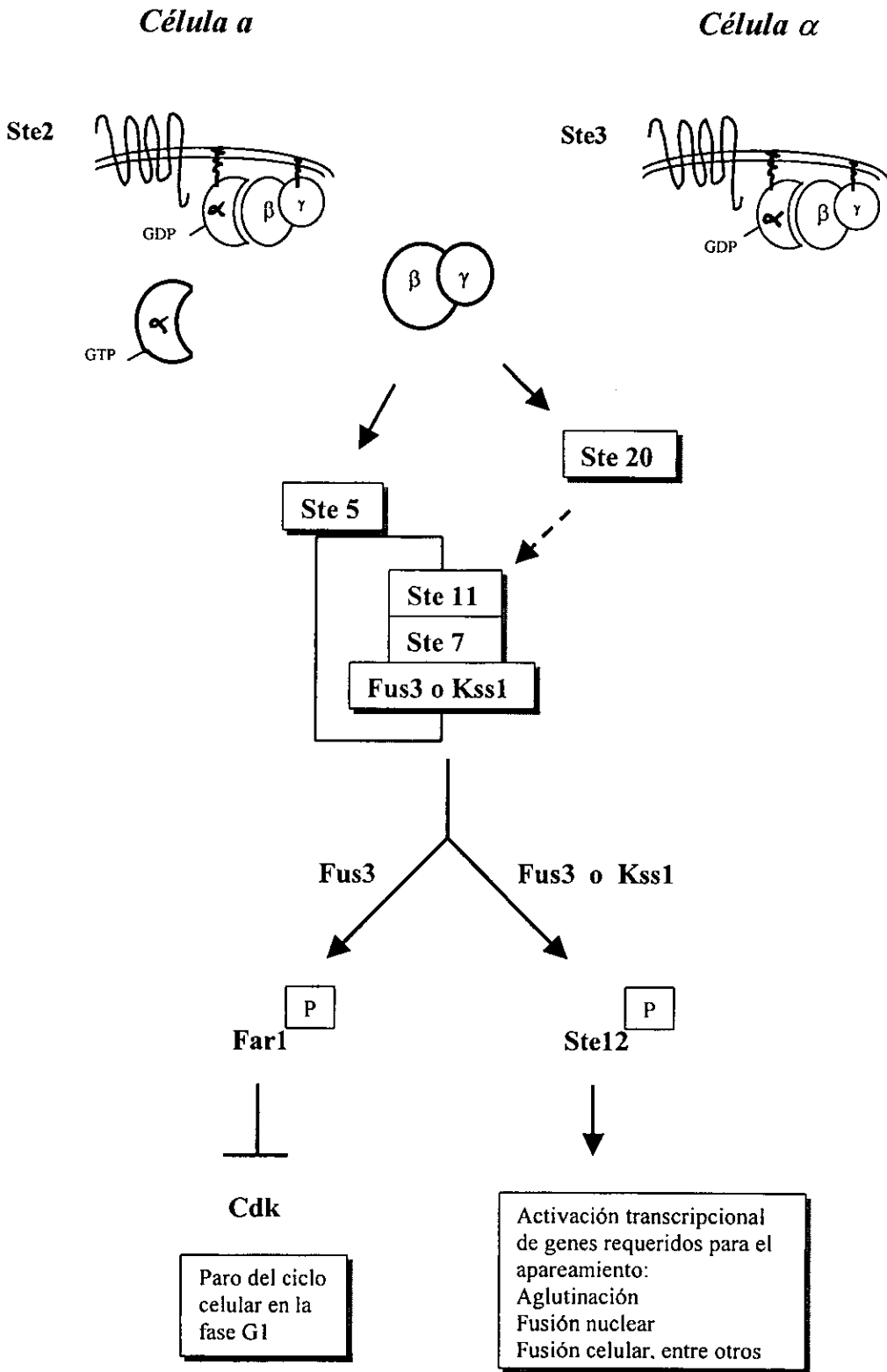


Figura 7. Sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae*

del ciclo celular en la fase G1, transcripción de genes específicos y fusión celular y nuclear (Kurjan, 1992, 1993; Sprague, 1992). La vía no es estrictamente secuencial porque sus componentes son interdependientes y regulan otras proteínas además de su efector inmediato cascada abajo (Sprague, 1991).

La activación de la cascada de MAP cinasas parece depender únicamente de la interacción de G β con sus efectores inmediatos, las proteínas Ste5 y Ste20 (Leberer *et al*, 1992 y 1993). Ste5 funciona como una proteína “de andamio” o “recrutadora” que parece aumentar la especificidad de la cascada de cinasas al bloquear interacciones inapropiadas con otras proteínas involucradas en vías relacionadas, mientras que Ste20 es una cinasa de serinas/treoninas que parece activar a Ste11 (MAPKKK), la cual a su vez fosforila y activa a Ste7 (MAPKK) y ésta a Fus3 (o Kss1) (MAPK) (Gustin *et al*, 1998). En este punto la cascada se divide en dos caminos, el primero de ellos conduce a Ste12, un factor transcripcional que se une a secuencias específicas de ADN (PRE, pheromone response elements) presentes en las secuencias de genes que responden a feromona. Ste12 parece ser blanco tanto de Fus3 como de Kss1 (Ferguson *et al*, 1994). El otro camino conduce al paro del ciclo celular: Fus3 (pero no Kss1) fosforila a Far1, el cual inhibe complejos de ciclasas necesarios para la continuación del ciclo (figura 7).

I.3.2 Diferenciación pseudohifal

En condiciones de limitación de nitrógeno y abundante fuente de carbono fermentable las células diploides de *S. cerevisiae* sufren una transición dimórfica denominada diferenciación pseudohifal, durante la cual las células geman siguiendo un patrón unipolar, se alargan y pueden invadir el sustrato, además de que permanecen unidas después de la citocinesis, formando cadenas de células parecidas a hifas (figura 8) (Gimeno *et al*, 1992). La regulación de este proceso involucra al menos dos vías de señalización, que se conectan entre sí (figura 9); una de estas vías es la cascada de MAP cinasas que incluye a Ste20, Ste11, STE7 y Kss1, y a los factores transcripcionales Ste12 y Tec1. Como se mencionó anteriormente, esta misma cascada forma parte de la respuesta a las feromonas, pero ni los receptores ni la proteína G formada por Gpa1/Ste4/Ste18 participan en la regulación del crecimiento pseudohifal: estos genes no se expresan en células diploides (Liu *et al*, 1993; Dolan y Fields, 1991).

La segunda vía funciona a través de la regulación de los niveles de AMP cíclico. El primer sistema de regulación de la enzima adenilato ciclasa descrito en *S. cerevisiae* fue el que involucra a las pequeñas GTPasas Ras1 y Ras 2 (figura 9). Ras2p al ser activada estimula a la adenilato ciclasa para producir AMP cíclico (Toda *et al*, 1985), lo que conduce a la activación de la cinasa de proteína A (PKA); Tpk2p, una de las tres subunidades catalíticas de PKA, es quien específicamente controla el desarrollo pseudohifal (Robertson y Fink, 1998).

La subunidad G α de *S. cerevisiae* denominada GPA2 ha sido involucrada en la regulación de la enzima adenilato ciclasa debido a que la sobreexpresión de la proteína causa un aumento en los niveles de AMP cíclico (Nakafuku *et al*, 1988; Papanavvas *et al*, 1992) y restablece los defectos causados por una mutación sensible a la temperatura en *RAS2*; sin embargo, el hecho de que una mutante Δ *gpa2* no muestre defectos en la producción de AMP cíclico (Nakafuku *et al*, 1988) ha dificultado la elucidación de su función. Algunas investigaciones recientes muestran que Gpa2p forma parte de la maquinaria encargada de la regulación del desarrollo pseudohifal a través del

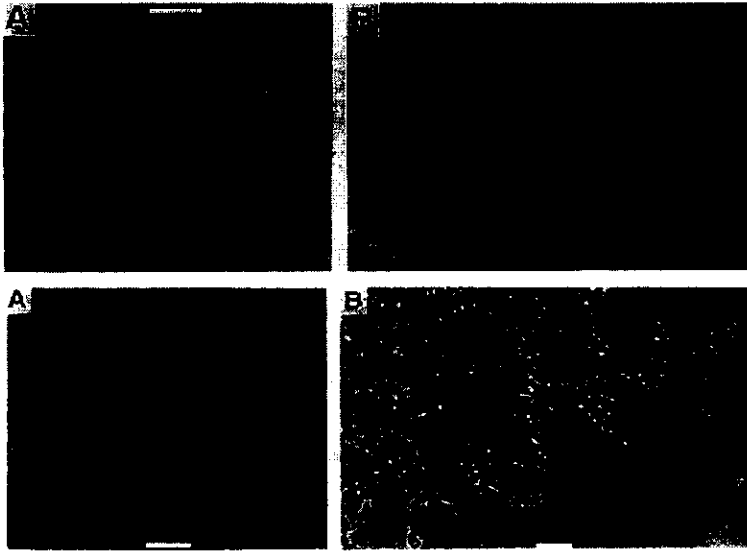


Figura 8. Crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae*. Foto sup. izq. célula en crecimiento vegetativo, sup. der. célula elongada en desarrollo filamentoso. Inferior, formación de pseudohifas. (Gimeno *et al.*, 1992)

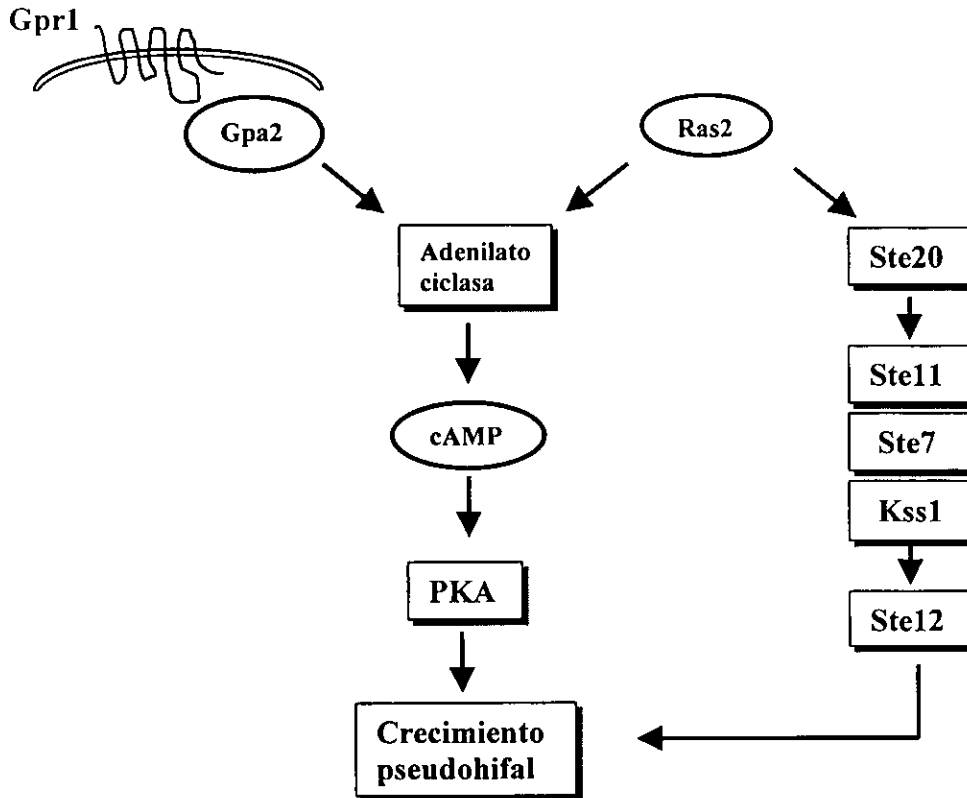


Figura 9. Vías de señalización Ras-Gpa2

monitoreo de nutrientes y la regulación de los niveles de AMP cíclico (Kübler *et al*, 1997; Lorenz y Heitman, 1997) (figura 9): el receptor denominado GPR1 (Yun *et al*, 1998; Xue *et al*, 1998) parece inducirse transcripcionalmente en condiciones de bajo contenido de nitrógeno para sensar la presencia de azúcares fermentables (Lorenz *et al*, 2000); la unión del ligando a Gpr1p estimula el intercambio de GDP por GTP en Gpa2p, la cual parece activar directamente a la enzima adenilato ciclasa, produciendo AMP cíclico. Ras2p es capaz de regular el desarrollo pseudohifal a través de ambas vías, la de MAP cinasas y la de AMPc-PKA (Gimeno *et al*, 1992), y estudios recientes muestran que ambas cascadas convergen para regular coordinadamente la floculina Flo1 1, la cual se requiere para la diferenciación pseudohifal diploide (Lorenz *et al*, 2000).

1.4 Proteínas G en el reino fungi

Aunque *S. cerevisiae* sigue siendo el eucarionte inferior más estudiado, cada vez el campo de investigación basado en otras especies de levadura ha ido en aumento. Los motivos que han generado el interés en otros organismos son variados, incluyendo la importancia médica, industrial y comercial de algunas de estas especies (Sudbery, 1994). Por otra parte, los sistemas simples de estos organismos permiten generar fácilmente mutantes que ayudan a identificar los componentes de las vías a través de análisis genéticos y bioquímicos. A la fecha se conocen unos 24 genes G α aislados de diferentes hongos, los cuales están involucrados en procesos como apareamiento, patogenicidad, desarrollo y morfogénesis, aunque las vías de señalización en que participan varias de estas proteínas son aún desconocidas (Tabla III). Particularmente, en hongos se han identificado pocos receptores acoplados a proteínas G, y solo se conocen efectores potenciales como la enzima adenilato ciclasa y cascadas de MAP cinasas (Gustin *et al*, 1998; Banuett, 1998).

En varias levaduras y otros hongos, las subunidades G α han sido implicadas en vías de señalización que regulan apareamiento y virulencia. En el basidiomiceto *Ustilago maydis* se han identificado cuatro subunidades G α , una de las cuales (Gpa3) se requiere tanto para virulencia como para apareamiento (Regenfelder *et al*, 1996). De manera similar, en *C. parasitica*, un ascomiceto patógeno de plantas, una vía mediada por proteínas G regula la virulencia (Gao y Nuss, 1996). En la respuesta a feromonas de apareamiento de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, están involucradas proteínas G heterotriméricas (Nomoto *et al*, 1990; Obara *et al*, 1991). Ambos organismos poseen una segunda subunidad G α responsable de la respuesta a privación de nutrientes (Isshiki *et al*, 1992; Lorenz y Heitman, 1997). Particularmente, en *S. pombe*, así como en *C. neoformans*, se requieren las dos señales para aparearse: feromona y privación de nitrógeno (Isshiki *et al*, 1992; Alspaugh, 1997).

La regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico es otro de los procesos que comúnmente es regulado en hongos por proteínas G (Bölker, 1998). Vías dependientes de este segundo mensajero están involucradas en el desarrollo filamentoso de *S. cerevisiae* (Lorenz y Heitman, 1997), en el apareamiento de *S. pombe* (Isshiki *et al*, 1992) y en el apareamiento y virulencia de *U. maydis* (Regenfelder *et al*, 1996) y *C. parasitica* (Chen *et al*, 1996).

Tabla III. Subunidades G α de hongos

Organismo	Grupo Taxonómico	Nombre	Función
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomiceto	Gpa1 Gpa2	Regulación de la vía de feromonas Regulación de crecimiento filamentoso
<i>Candida albicans</i>	Ascomiceto	Cag1	Complementa mutantes Δ Gpa1 de <i>S.cerev.</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomiceto	Gpa1 Gpa2	Regulación de la vía de feromonas Respuesta a contenido bajo de nitrógeno
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomiceto	Gna1 Gna2	Fertilidad del organismo femenino Desconocida
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomiceto	FadA	Reg. negativo del desarrollo asexual
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Ascomiceto	Cpg1 Cpg2	Regulación de virulencia y fertilidad Desconocida
<i>Magnaporthe grisea</i>	Ascomiceto	MagA MagB MagC	Requerido para virulencia Desarrollo de ascosporas Desarrollo de ascosporas
<i>Colleotrichum trifolii</i>	Ascomiceto	Ctg1	Desconocida
<i>Pneumocystis carinii carinii</i>	Ascomiceto	Pcg1	Desconocida
<i>Pneumocystis carinii ratti</i>	Ascomiceto	Pcg1	Desconocida
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomiceto	Gpa1 Gpa2 Gpa3 Gpa4	Desconocida Desconocida Respuesta a feromonas, morfogénesis y patogenicidad Desconocida
<i>Ustilago hordei</i>	Basidiomiceto	Fil 1	Regulación del crecimiento filamentoso
<i>Coprinus congregatus</i>	Basidiomiceto	Cgpa1	Regulación de fotomorfogénesis
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	Gpa1	Respuesta a feromonas y virulencia, regulación de AMPc

*Bölker, 1998

1.5 *Kluyveromyces lactis*: un modelo alterno

La levadura que ahora conocemos como *K. lactis* es un ascomiceto heterotálico que fue originalmente denominada *Saccharomyces lactis*, pero dado que es incapaz de aparearse con organismos del género *Saccharomyces*, fue agrupada bajo el género *Kluyveromyces* y clasificada como *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, mejor conocida por el nombre corto de *K. lactis*. Morfológicamente, *K. lactis* es similar a *S. cerevisiae*, sólo que de menor tamaño. Los ciclos de vida de ambas levaduras son muy similares (figura 6), con la diferencia de que la fase diploide en *K. lactis* no es estable como en *S. cerevisiae*, por lo que tiende a esporular espontáneamente (Wesolowski-Louvel, 1996).

El genoma total haploide de *K. lactis* ha sido estimado en aproximadamente 12 millones de pares de bases (Mpb); la estimación se hizo con base en la identificación de seis cromosomas de gran tamaño, numerados del I al VI, desde el más pequeño (aprox. 1.1 Mpb) hasta el más grande (aprox. 3 Mpb) (Wesolowski-Louvel y Fukuhara, 1995). El genoma de *K. lactis* contiene rara ocurrencia de intrones y regiones intergénicas cortas (Ozier-Kalogeropoulos *et al*, 1998).

K. lactis asimila una amplia variedad de fuentes de carbono, más aún que *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Una propiedad que la distingue es su habilidad para usar lactosa como única fuente de carbono y energía (Wesolowski-Louvel y Fukuhara, 1995). La degradación de lactosa, así como la producción de β -galactosidasa, son aplicaciones de gran escala para esta levadura (Sudbery, 1994).

Desde hace varios años, *Kluyveromyces lactis* se ha utilizado ampliamente en la industria biotecnológica por su alta capacidad para expresar genes heterólogos y su habilidad para secretar proteínas de alto peso molecular (Wesolowski-Louvel y Fukuhara, 1995). *S. cerevisiae* había sido la levadura más utilizada para la expresión de genes heterólogos, sin embargo, este sistema ha presentado varias limitaciones, tales como secreción y productividad ineficientes, hiperglicosilación, inestabilidad de las cepas y dificultades con las fermentaciones de alta densidad (Swinkels *et al*, 1993). En contraste, a la fecha no se han detectado proteasas que interfieran con la producción de proteínas en los cultivos de *K. lactis*, y los procesos recombinantes de esta levadura han sido escalados sin pérdida de productividad (Swinkels *et al*, 1993). Otra ventaja de esta levadura es que, al igual que *S. cerevisiae*, puede ser fácilmente manipulada genéticamente y los métodos de biología y genética molecular que han sido desarrollados para *S. cerevisiae* funcionan sin problemas en *K. lactis* (Swinkels *et al*, 1993).

A nivel fisiológico y molecular, la investigación sobre *K. lactis* ha estado siempre precedida por lo descubierto en *S. cerevisiae*, debido a su relación filogenética. La mayor parte de los genes de *K. lactis* que a la fecha se conocen, han sido identificados con base en su homología con los genes de *S. cerevisiae*, o por complementación de mutantes (Ozier-Kalogeropoulos *et al*, 1998). Sin embargo, se ha descubierto que, a pesar de ser organismos estrechamente relacionados evolutivamente, existen procesos importantes que son regulados de manera diferente en ambas levaduras; ejemplos de esto son la ausencia de represión catabólica y la inducción por etanol de la enzima alcohol deshidrogenasa en *K. lactis* (Wesolowski-Louvel y Fukuhara, 1995).

La transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas ha cobrado gran relevancia en un sinnúmero de campos de investigación, debido a que este tipo de proteínas está involucrado en una amplia diversidad de procesos. La conservación a lo largo de la evolución de estos procesos en que

participan las proteínas G, ha permitido el uso de organismos simples como modelos de estudio, como es el caso de la levadura *S. cerevisiae*. A través de los años, ha sido necesaria la búsqueda de modelos alternativos en ésta y otras áreas de investigación, con el fin de aclarar las incógnitas que no han sido despejadas en los prototipos conocidos. Los sistemas de transducción de señales mediados por proteínas G en la levadura *Kluyveromyces lactis* son prácticamente desconocidos. En 1993, el grupo de S. Fields reportó la clonación del gen *STE12* de *K. lactis* (Yuan et al, 1993). En *S. cerevisiae*, *STE12p* es el activador transcripcional que se encuentra al final de la cascada de respuesta a feromonas de apareamiento (figura 7): *STE12p* se une a secuencias específicas en los genes que responden a feromona (Ferguson et al, 1994). De acuerdo al trabajo de Yuan et al, de manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la secuencia regulatoria (corriente arriba del ATG inicial) del gen *STE12* de *K. lactis*, contiene secuencias que podrían responder al estímulo por feromona. Sin embargo, *STE12p* de *K. lactis* sólo es capaz de restablecer completamente el proceso de apareamiento en una mutante *stel2* de *S. cerevisiae* del sexo a. Al parecer, el dominio de unión a las secuencias en el ADN es similar para los dos homólogos *STE12*, pero la diferencia radica en el dominio de activación (Yuan et al, 1993).

II. Antecedentes del proyecto

Como parte del proyecto de caracterización de los sistemas de señalización que involucran proteínas G en *K. lactis*, en el laboratorio del Dr. Roberto Coria hemos clonado y caracterizado parcialmente el gen de una subunidad $G\alpha$ de esta levadura. El trabajo se publicó en el artículo "Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Los datos obtenidos se resumen a continuación (el artículo completo se ha incluido como el apéndice A).

Utilizando ADN cromosomal de *Kluyveromyces lactis* como templado, y oligonucleótidos degenerados, diseñados sobre regiones conservadas de subunidades $G\alpha$ ya reportadas, se amplificaron por PCR dos productos de aproximadamente 0.5 kb y 0.8 kb. La secuencia de ambos fragmentos mostró homología con subunidades $G\alpha$ de diferentes organismos. Usando el fragmento de 0.5 kb como sonda, se llevó a cabo una búsqueda en una biblioteca genómica de *K. lactis*, lográndose clonar un gene (*KIGPA2*) cuya secuencia deducida de aminoácidos muestra, dependiendo del alineamiento, 62% de similitud y 38% de identidad con *Gpa1p* y 76% de similitud y 63% de identidad con *Gpa2p*, las subunidades $G\alpha$ de *S. cerevisiae*. *KIGPA2* se encuentra en copia única y la interrupción de este gen produce células viables con una reducción significativa del nivel de AMP cíclico, lo que indica que esta subunidad $G\alpha$ podría estar involucrada en la regulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa y no en la respuesta a feromonas de apareamiento. *KIGpa2p* comparte algunas características estructurales con miembros de la familia $G\alpha$ s de mamíferos (que estimulan la adenilato ciclasa) como la ausencia en su región amino terminal de la secuencia para modificación por unión de ácido mirístico

participan las proteínas G, ha permitido el uso de organismos simples como modelos de estudio, como es el caso de la levadura *S. cerevisiae*. A través de los años, ha sido necesaria la búsqueda de modelos alternativos en ésta y otras áreas de investigación, con el fin de aclarar las incógnitas que no han sido despejadas en los prototipos conocidos. Los sistemas de transducción de señales mediados por proteínas G en la levadura *Kluyveromyces lactis* son prácticamente desconocidos. En 1993, el grupo de S. Fields reportó la clonación del gen *STE12* de *K. lactis* (Yuan et al, 1993). En *S. cerevisiae*, *STE12p* es el activador transcripcional que se encuentra al final de la cascada de respuesta a feromonas de apareamiento (figura 7): *STE12p* se une a secuencias específicas en los genes que responden a feromona (Ferguson et al, 1994). De acuerdo al trabajo de Yuan et al, de manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la secuencia regulatoria (corriente arriba del ATG inicial) del gen *STE12* de *K. lactis*, contiene secuencias que podrían responder al estímulo por feromona. Sin embargo, *STE12p* de *K. lactis* sólo es capaz de restablecer completamente el proceso de apareamiento en una mutante *stel2* de *S. cerevisiae* del sexo a. Al parecer, el dominio de unión a las secuencias en el ADN es similar para los dos homólogos *STE12*, pero la diferencia radica en el dominio de activación (Yuan et al, 1993).

II. Antecedentes del proyecto

Como parte del proyecto de caracterización de los sistemas de señalización que involucran proteínas G en *K. lactis*, en el laboratorio del Dr. Roberto Coria hemos clonado y caracterizado parcialmente el gen de una subunidad $G\alpha$ de esta levadura. El trabajo se publicó en el artículo "Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*". Los datos obtenidos se resumen a continuación (el artículo completo se ha incluido como el apéndice A).

Utilizando ADN cromosomal de *Kluyveromyces lactis* como templado, y oligonucleótidos degenerados, diseñados sobre regiones conservadas de subunidades $G\alpha$ ya reportadas, se amplificaron por PCR dos productos de aproximadamente 0.5 kb y 0.8 kb. La secuencia de ambos fragmentos mostró homología con subunidades $G\alpha$ de diferentes organismos. Usando el fragmento de 0.5 kb como sonda, se llevó a cabo una búsqueda en una biblioteca genómica de *K. lactis*, lográndose clonar un gene (*KIGPA2*) cuya secuencia deducida de aminoácidos muestra, dependiendo del alineamiento, 62% de similitud y 38% de identidad con *Gpa1p* y 76% de similitud y 63% de identidad con *Gpa2p*, las subunidades $G\alpha$ de *S. cerevisiae*. *KIGPA2* se encuentra en copia única y la interrupción de este gen produce células viables con una reducción significativa del nivel de AMP cíclico, lo que indica que esta subunidad $G\alpha$ podría estar involucrada en la regulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa y no en la respuesta a feromonas de apareamiento. *KlGpa2p* comparte algunas características estructurales con miembros de la familia $G\alpha$ s de mamíferos (que estimulan la adenilato ciclasa) como la ausencia en su región amino terminal de la secuencia para modificación por unión de ácido mirístico

III. Objetivos

La levadura *K. lactis* ha cobrado importancia como modelo alternativo debido a que, a pesar de ser un organismo filogenéticamente cercano a *S. cerevisiae*, con la que comparte un gran número de características, presenta una regulación diferente a la de *S. cerevisiae* en varios de sus procesos. Por otra parte, *K. lactis* posee todas las ventajas del modelo clásico, en cuanto a la manipulación molecular y genética de sus sistemas. En particular, con base en los datos que se han mencionado en la introducción y los que ha aportado el artículo que antecede a este trabajo, la manera en que las proteínas G regulan las vías en que están involucradas en *K. lactis* resulta particularmente interesante. Considerando los puntos anteriores, es de nuestro interés continuar el estudio de los sistemas de transducción de señales mediados por proteínas G heterotriméricas en *Kluyveromyces lactis*. El presente trabajo ha sido enfocado hacia la caracterización de las subunidades $G\alpha$ de esta levadura, por lo que los objetivos que se plantearon fueron los siguientes:

II.1 Objetivo general

Caracterizar estructural y funcionalmente las subunidades α de proteínas G heterotriméricas de la levadura *Kluyveromyces lactis*.

II.2 Objetivos particulares

Los objetivos específicos planteados para cubrir el objetivo general fueron:

- Determinar las características básicas de las subunidades α de *K. lactis*, a través de la clonación y secuencia de los genes correspondientes y del posterior análisis de su estructura primaria en comparación con las subunidades α reportadas para diferentes organismos.
- Establecer en qué procesos se encuentran involucrados los genes $G\alpha$ de *K. lactis* y el papel que desempeñan en éstos, partiendo de lo descrito para otros organismos relacionados y analizando el comportamiento de mutantes.
- Hacer un análisis comparativo de las subunidades $G\alpha$ de *K. lactis* con las de *S. cerevisiae* y otros organismos relacionados. Establecer las equivalencias y diferencias entre ellas tanto en estructura como en función.
- Utilizando un sistema *in vivo* de interacción de proteínas, determinar y analizar las características básicas de la interacción de α y $\beta\gamma$ (homólogas y heterólogas). Con base en las estructuras reportadas para las tres subunidades, establecer las diferencias en las regiones de interfase entre α y β .

IV. Resultados

Los resultados se dividen en dos secciones, la primera contenida en el artículo:

The *KlGpa1* gene encodes a G protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis* (2000) *J. Bacteriol*, en prensa.

La segunda sección se compone de los datos completos obtenidos de los experimentos de interacción de las subunidades, que se mencionan brevemente en el artículo sobre *KlGpa1*.

Sección IV.1 Resumen del artículo: The *KlGpa1* gene encodes a G protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis* (2000) J. Bacteriol. En prensa

La clonación del gen *KlGpa1* se logró a través de una búsqueda en una biblioteca genómica de *K. lactis*, utilizando como sonda el fragmento de 0.8 kb obtenido anteriormente por PCR (Saviñón-Tejeda *et al*, 1996). El marco abierto de lectura contiene 1344 nucleótidos incluyendo el codón de término. La estructura primaria deducida de la proteína (de 447 residuos de aminoácidos) es muy parecida a la de Gpa1p, la subunidad $G\alpha$ de *S. cerevisiae* involucrada en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con Gpa1 de *S. cerevisiae*, la interrupción de *KlGpa1* produce células viables con una capacidad de apareamiento reducida. La expresión a través de un plásmido de *KlGpa1* en una mutante $\Delta Klgpa1$ restablece completamente la capacidad de aparearse, por lo que concluimos que KlGpa1p tiene un papel positivo en la vía de respuesta a las feromonas. La sobreexpresión de una subunidad *KlGpa1* constitutiva (que permanece unida a GTP), en la que se ha mutado la asparagina 364 por lisina, KlGpa1p(K³⁶⁴), no induce de manera constitutiva la vía de respuesta a feromona, y en cambio reduce la capacidad de apareamiento de una cepa silvestre y no es capaz de restaurar esta misma capacidad en la mutante $\Delta Klgpa1$. *K. lactis* expresa una segunda subunidad $G\alpha$, KlGpa2p, involucrada en la regulación de los niveles de AMP cíclico después de una estimulación por glucosa. Esta subunidad no rescata a las mutantes $\Delta Klgpa1$ de la esterilidad, pero su sobreexpresión reduce ligeramente la capacidad de aparearse de una cepa silvestre, lo que sugiere una relación entre la vía de respuesta a feromonas, mediada por KlGpa1p, y el metabolismo de glucosa mediado por KlGpa2p. La doble mutante $\Delta Klgpa1, \Delta Klgpa2$, aunque viable, presenta la misma deficiencia para aparearse observada en la mutante sencilla $\Delta Klgpa1$.

The *KlGpa1* Gene Encodes a G Protein α Subunit That Is a Positive Control Element in the Mating Pathway of the Budding Yeast *Kluyveromyces lactis*

ALMA L. SAVIÑÓN-TEJEDA, LAURA ONGAY-LARIOS, JULIÁN VALDÉS-RODRÍGUEZ,
AND ROBERTO CORIA*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

Received 11 July 2000/Accepted 4 October 2000

The cloning of the gene encoding the *KlGpa1p* subunit was achieved by standard PCR techniques and by screening a *Kluyveromyces lactis* genomic library using the PCR product as a probe. The full-length open reading frame spans 1,344 nucleotides including the stop codon. The deduced primary structure of the protein (447 amino acid residues) strongly resembles that of *Gpa1p*, the G protein α subunit from *Saccharomyces cerevisiae* involved in the mating pheromone response pathway. Nevertheless, unlike disruption of *Gpa1* from *S. cerevisiae*, disruption of *KlGpa1* rendered viable cells with a reduced capacity to mate. Expression of a plasmidic *KlGpa1* copy in a $\Delta Klgpa1$ mutant restores full mating competence; hence we conclude that *KlGpa1p* plays a positive role in the mating pathway. Overexpression of the constitutive subunit *KlGpa1p(K³⁶⁴)* (GTP bound) does not induce constitutive mating; instead it partially blocks wild-type mating and is unable to reverse the sterile phenotype of $\Delta Klgpa1$ mutant cells. *K. lactis* expresses a second G α subunit, *KlGpa2p*, which is involved in regulating cyclic AMP levels upon glucose stimulation. This subunit does not rescue $\Delta Klgpa1$ cells from sterility; instead, overproduction of *KlGpa2p* slightly reduces the mating of wild-type cells, suggesting cross talk within the pheromone response pathway mediated by *KlGpa1p* and glucose metabolism mediated by *KlGpa2p*. The $\Delta Klgpa1 \Delta Klgpa2$ double mutant, although viable, showed the mating deficiency observed in the single $\Delta Klgpa1$ mutant.

* *Saccharomyces cerevisiae* cells respond to mating pheromones by inducing activation of a G protein coupled to serpentine receptors (reviewed in reference 17). The G protein, composed of G α (*Gpa1p*), G β (*Ste4p*), and G γ (*Ste18p*) subunits, activates a phosphorylation cascade that involves at least *Ste20p*, the mitogen-activated protein kinase module, and transcription activators (reviewed in reference 9) that finally induce growth arrest, shmoo formation, induction of genes required for membrane fusion, including *Fus1*, and diploid formation. Epistasis analysis has established that the mating response is mediated by the *Ste4* and *Ste18* gene products and that lack of *Gpa1p* in *S. cerevisiae* confers lethality and lack of either *Ste4p* or *Ste18p* give rise to sterility (6, 29).

A second G α (*Gpa2p*) subunit (19) was identified and was involved, along with *Ras2p*, in the activation of adenylyl cyclase to induce cyclic AMP (cAMP) production in response to glucose stimulus. Isolation of *Gpr1p*, the seven-transmembrane segment receptor coupled to *Gpa2p*, showed that the *Gpr1p/Gpa2p* pathway acts in parallel to the Ras/cAMP pathway monitoring nutrient signals (4, 30). It has been showed that *Gpa2p* regulates growth and pseudohyphal development generated by nitrogen starvation (14).

In *S. cerevisiae* *Gpa1p* and *Gpa2p* subunits play divergent and unrelated roles in signal transduction, since *Gpa1p* does

not participate in the integration of nutrient signals and *Gpa2p* does not participate in the pheromone response pathway required for mating.

Kluyveromyces lactis is heterothallic budding yeast that is essentially aerobic (reviewed in reference 28). Its life cycle resembles that of *S. cerevisiae*, and the haploid and diploid vegetative growth and sexual reproduction of the two are highly similar. *K. lactis* shows two mating partners that undergo sexual reproduction when they respond to sexual pheromones. *Mata* and *Mata α* cells are able to mate with each other to produce transient diploids that sporulate to generate four spores that germinate to haploid clones of two different mating types (8). We hypothesize that an *S. cerevisiae*-like pheromone response pathway is conserved in *K. lactis*. In fact a gene encoding a protein highly homologous to the α mating factor of *S. cerevisiae* has been identified (3). This sexual pheromone is thought to activate a pathway that finally turns on transcription factor *KlSte12p* (31). This factor is thought to bind to pheromone response elements located in promoter regions of genes required for mating. We are interested in searching for homologue genes coding for components of the G protein putatively involved in transducing the pheromone stimulus. In particular, here we describe the characterization of a gene encoding a G α subunit that participates in the mating pathway. Like *S. cerevisiae*, *K. lactis* expresses a second G α subunit (*Gpa2p*) that is directly involved in regulation of cAMP levels in response to glucose stimulus (25).

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F., México. Phone: (525) 622 56 52. Fax: (525) 622 56 30. E-mail: rcoria@ifisiol.unam.mx.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and media. *K. lactis* strains used in this study were WM37 (NRRL Y-1140) (*Mata his3*); MD2/1 (*MATA argA lysA uraA*) (obtained from H. Fukuhara); 12/8 (*Mata argA lysA uraA*), a segregant of the cross between WM37

and MD2/1 that was used as tester strain; 155 (*Mata ade2 his3 ura4*), a segregant of the cross between MD2/1 and KAS-6C (*Mata ade2 his3 leu1*), of unknown origin (obtained from A. Brunner); and 136 (*Mata arg4 his3 ura4*), a segregant of the cross between WM37 and MD2/1. Homozygotic *his3 ura4* diploids were freshly generated by crossing strain 155 with strain 136. *S. cerevisiae* strains used in this study were W303-1A (*Mata ade2-1 his3 leu2 trp1 ura3 can1-100*), W303-3B (*Mata ade2-1 his3 leu2 trp1 ura3 can1-100 scg1::Ura3*), and 70 (*Mata thr3*). *Escherichia coli* strain DH5 α was used to propagate plasmids. Phagemid pTZ18R was used to subclone DNA fragments for sequencing. Vector YEpkD, which contains the *Ura3* marker, was constructed by replacing the 2 μ m replication origin of vector YEpk352 (10) by replication origin pKD from vector KEp6 (obtained from H. Fukuhara). Vector YEpkDHis was constructed by replacing the *Ura3* marker by the *His3* marker in YEpkD. The multicopy plasmid YEpkDHis-KIGpa1 was constructed by subcloning a 2.2-kb *Pst*I fragment carrying the complete KIGpa1 open reading frame (ORF) into YEpkDHis digested with the same enzyme. This places KIGpa1 under the control of its own promoter. YEpkDHis-KIGpa2 was constructed by subcloning a 1.9-kb *Sall*-*Bam*HI fragment that carries the KIGpa2 ORF and its promoter into YEpkDHis digested with the same enzymes. Construction of a genomic DNA library from *K. lactis* was described previously (18). YPD medium contained 1% yeast extract, 1% Bacto peptone, and 2% glucose. SD medium contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and 25 mg of the required amino acids/ml. Luria-Bertani medium supplemented with 50 mg of ampicillin/ml was used to grow recombinant bacteria.

PCR-mediated mutagenesis. Construction of KIGpa1p(K^{M44}) was done by standard PCR amplification. The 5' AATATCTACTTTTAAAGAATAGT 3' oligodeoxynucleotide (from position 1077 to 1101), which replaces cytosine with adenine at position 1089 of the sense strand (thereby replacing N^{M44} with K in the putative protein), was used as the backward primer in a reaction that yielded a 277-bp amplification product. This fragment was then used as the forward primer in a second reaction that yielded a 643-bp product containing the naturally occurring sites *Clal* (position 1016) and *Bst*EII (93 bp beyond the stop codon). The *Clal*-*Bst*EII fragment was then subcloned back into the original wild-type gene. PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min; 50 cycles of 94°C for 30 s, 45°C for 45 s, and 72°C for 60 s; and a final extension of 10 min at 72°C.

Cloning and sequencing. The screening of a *K. lactis* genomic DNA library was done using the PCR product as a probe labeled with [α -³²P]dCTP by random-primer DNA-labeling systems (Life Technologies). Positive clones were mapped with restriction enzymes, and one of them, containing the full gene, was sequenced in an automatic sequencer (ABI Prism 310; Applied Biosystems) at the Molecular Biology Facilities of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The sequence was analyzed using the GCG program from the Wisconsin Sequence Analysis Package.

Gene disruption. The *Ura3* marker, obtained as an *Hpa*I/*Bam*HI fragment (filled-in *Hpa*I) was inserted into KIGpa1 previously digested at the naturally occurring sites *Xho*I (position 770) and *Bam*HI (position 914) (filled-in *Xho*I). The resulting plasmid was treated with *Bgl*II, which digests KIGpa1 at positions 377 and 1119, to give rise to a cassette that carries the *Ura3* marker flanked by fragments of 138 and 218 bp of the KIGpa1 ORF. This cassette was used to transfect haploid and diploid strains. Disruption of the KIGpa2 allele with the *Ura3* marker was described previously (25). Disruption of KIGpa2 with the *His3* cassette was as follows. The KIGpa2 gene was opened with *Bgl*II at positions 348, 408, and 478. A 1.8-kb *Bam*HI fragment containing the *His3* gene was then inserted. This construction was used as the template in a PCR using primers directed against KIGpa2 at positions 145 (forward) and 691 (backward), giving rise to a cassette containing the *His3* gene flanked by KIGpa2 sequences of 204 and 213 bp, respectively. This was used to transfect haploid and diploid strains. Disruptions were confirmed by Southern blotting techniques.

Southern blot and Northern blot analysis. Chromosomal and plasmidic DNA blots as well as RNA blots were hybridized with a ³²P-labeled probe; the probe was labeled with the randomly primed system kit (Gibco BRL). Blots were hybridized overnight at 55°C and washed twice with 2 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and twice with 1 \times SSC-0.1% SDS. All washes were done at 65°C for 10 min.

Mating assays. A patch of cells of the strain to be tested was grown on a plate of selective medium for 24 h. The tester strain was grown as a lawn on a YPD plate for 24 h. Both strains were replica plated onto a YPD plate and incubated overnight at 30°C to allow cells to mate. Diploids were selected on SD medium by replica plating. For quantitative mating assays, strains to be tested were grown until mid-log phase in YPD medium. Then 10⁶ cells were mixed with 10⁶ cells of the tester strain, collected on a nitrocellulose membrane filter, placed on a YPD plate, and incubated overnight at 30°C. The cells from each filter were suspended in water, diluted, and plated on SD medium.

Two-hybrid interaction assays. Assays of physical interaction were done with the LexA-B42 two-hybrid systems as described previously (7). *S. cerevisiae* *Gpa1* and *Ste4* genes were subcloned into pJG4-5 and pEG202 as described previously (21). KIGpa1 and KIGpa2 were amplified by PCR, introducing *Nco*I (position -1) and *Eco*RI (position -5)*Bam*HI (18 nucleotides after the stop codon) sites, respectively. PCR products were subcloned in frame into pEG202.

Other. Expression of *Fus1-LacZ* fusion was done as described previously (21). Molecular biology procedures were performed as described by Sambrook et al. (24). Standard yeast genetics procedures were done as described by Sherman et al. (26).

Nucleotide sequence accession number. The sequence obtained in this study has been assigned GenBank accession no. AF135552.

RESULTS

By means of PCR we were able to amplify two products belonging to genes encoding α subunits of heterotrimeric G proteins. We have already demonstrated that one of these genes, KIGpa2, encodes a subunit directly involved in the regulation of cAMP levels in *K. lactis* (25). Cells lacking KIGpa2p are viable but fail to respond to transient stimulus by glucose and the cAMP level drops significantly, indicating that the G protein containing KIGpa2p is involved in regulating the activity of adenylyl cyclase and participates in a pathway related to monitoring the nutrient status of the cell (25).

The other PCR product was used as a probe to screen a *K. lactis* genomic library looking for the full-length gene. Two positive clones were obtained; one showed a 2.2-kb *Pst*I fragment that contained the complete ORF, as inferred from Southern blot analysis. The full sequence of this fragment contains an ORF of 1,344 nucleotides including the stop codon, which codes for a putative protein of 447 amino acid residues with a molecular mass of 50,739 Da.

Analysis of the deduced primary structure of the protein showed a high degree of identity with the Gpa2p from *K. lactis* and with the Gpa proteins from *S. cerevisiae*. Close examination reveals 64% identity and 72% similarity with the Gpa1p from *S. cerevisiae*. Based on these criteria it could be that the cloned gene encodes the putative homologue of the G α involved in the mating pathway of *S. cerevisiae*. The deduced primary structure of the protein (KIGpa1p) shows the characteristic structural domains conserved in G α subunits from different organisms (Fig. 1). It shows the typical G1 and G2 regions involved in the binding and hydrolysis of the guanine nucleotide. It also shows the consensus amino terminus end (MG-XXXXXX) that has been identified as an N-myristoylation target in members of the mammalian G α i family (11); however, unlike members of this family, KIGpa1p does not contain the cysteine residue at its carboxyl end that is ADP ribosylated by pertussis toxin (12), sharing this characteristic with the yeast G α subunits known so far. Like Gpa1p from *S. cerevisiae*, KIGpa1p shows an extra internal fragment of 75 amino acid residues between the conserved G1 region and the first module of the G2 region (Fig. 1).

In the budding yeast *S. cerevisiae*, the heterotrimeric G protein composed of the Gpa1p (G α), Ste4p (G β), and Ste18p (G γ) subunits mediates pheromone-induced growth arrest. Activation of the G protein promoted by the binding of pheromone involves dissociation of the α subunit from the $\beta\gamma$ dimer, which in turn activates a cascade signal that induces the expression of genes whose products are needed for conjugation (17). Lack of Gpa1p produces arrested cells with a transient

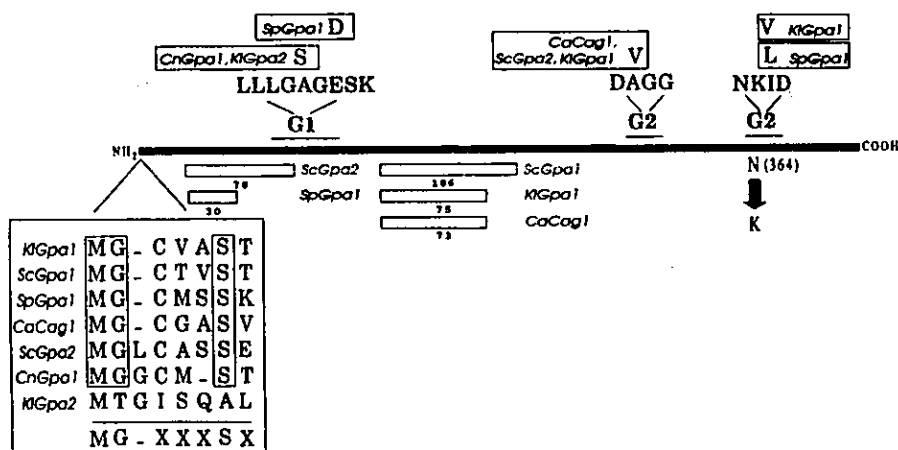


FIG. 1. Primary structure of yeast G α subunits. Rectangles below protein, inserts bigger than 29 amino acids. Amino acid sequences at the amino terminus are aligned, showing the consensus sequence for N-mristoylation. G1 and G2, conserved regions for guanine nucleotide binding and hydrolysis domains. Deviations from conserved sequences are boxed. N-to-K replacement at the G2 region that in *S. cerevisiae* confers the constitutive mating response is indicated. *Kl*, *K. lactis*; *Sc*, *S. cerevisiae*; *Sp*, *S. pombe*; *Ca*, *Candida albicans*; *Cn*, *C. neoformans*.

ability to mate, indicating that Gpa1p plays a negative role in the response to the mating pheromone. We tested if lack of KIGpa1p has the same effect on the pheromone response pathway of *K. lactis*. Disruption of *KIGpa1* of the strain 155 (*Mata ade2 his3 ura1*) was done by homologous recombination using a cassette containing the *URA3* marker flanked by fragments of 393 (from position 377 to 770) and 206 bp (from position 914 to 1119), respectively. Disruption of the gene and lack of its messenger were confirmed by Southern blot and Northern blot analyses, respectively (not shown). Unlike what was found for disruption of *Gpa1*, which causes shmoo formation and lethality in *S. cerevisiae* (6), *K. lactis* haploid cells carrying the disrupted allele were viable (Fig. 2A) and no significant effect on morphology and doubling time was observed. Although in mating cultures wild-type *K. lactis* cells do not show visible shmoo morphology, we have observed that the number of budding cells is reduced two- to threefold, which suggests that growth arrest is induced by the mating partner. In addition, the disrupted strain had a dramatic impairment in mating (Fig. 2A) and forming diploids, showing a 20-fold reduction from the wild-type efficiency. This defect is totally reversed by expression of wild-type *KIGpa1* under the control of its own promoter (Fig. 2B). Disruption of *KIGpa1* in a *Mata* background (strain 12/8 [*Mata argA lysA ura1*]) has the same effect as that in the *Mata* cell, i.e., a 20- to 30-fold reduction of mating efficiency, and the level of mating of both disrupted strains ($\Delta KIGpa1 \times \Delta KIGpa1$) is 0.001 of the wild-type level. Besides, after 72 h of incubation diploids appear in the selective medium.

On the other hand, disruption of *KIGpa2* did not affect viability or mating (Fig. 2A). As we showed, cells lacking *KIGpa2p* have a slight increase in doubling time and reach stationary phase much earlier than wild-type cells (25), indicating that they have a defect in monitoring nutrient conditions of the medium.

One possible explanation for the apparent sterile phenotype of $\Delta KIGpa1$ is that an excess of KIGpa2p is able to bind free β

produced either by pheromone activation or by lack of KIGpa1p. If this assumption is true, then overproduction of KIGpa2p should block the mating of wild-type cells and the double mutant ($\Delta KIGpa1 \Delta KIGpa2$) should be lethal and transiently able to mate. To test this hypothesis, we transfected wild-type cells with a multicopy plasmid carrying *KIGpa2* under

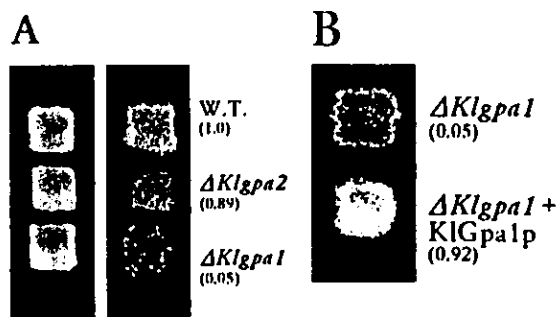


FIG. 2. (A) Effect of *KIGpa1* and *KIGpa2* disruption on growth properties and mating of *K. lactis* cells. Strain 155 (*Mata ade2 his3 ura1*), containing the wild-type (W.T.) or the disrupted alleles, was grown for 24 h on YPD plates (left) and then was replica plated to a YPD plate containing a lawn of the strain 12/8 (*Mata argA lysA ura1*) and incubated overnight at 30°C to allow cells to mate. Diploids were selected on SD medium supplemented with uracil (right). Numbers in parentheses, mating efficiencies relative to that of the wild type. Cells of the strain to be mated were combined with cells of the tester strain (12/8) on nitrocellulose membrane filters, placed on the surface of a YPD plate, and incubated overnight at 30°C. Cells were diluted and plated on SD medium. Mating efficiency is defined as the number of diploids divided by the number of haploids of the strain being tested. (B) The $\Delta KIGpa1$ strain carrying either YEpKIDHis or YEpKIDHis-KIGpa1 was grown on YPD medium for 24 h. Patches were replica plated to a YPD plate containing a lawn of the tester strain, incubated overnight at 30°C, and replica plated to selective medium for diploids. Mating efficiencies (in parentheses) were calculated as for panel A.

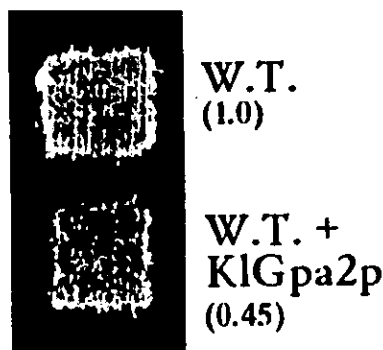


FIG. 3. Strain 155, transfected with either YE_pKDHis or YE_pKDHis-KIGpa2, was grown and mated as indicated for Fig. 2B. Patches of diploid cells were selected on SD supplemented with uracil. Mating efficiencies (in parentheses) were calculated as indicated for Fig. 2A. W.T., wild type.

the control of its own promoter. As shown in Fig. 3, mating was slightly reduced, indicating that KIGpa2p has the potentiality to interfere with the pheromone response pathway. As mentioned earlier, KIGpa2p does not participate in the mating pathway since cells devoid of this subunit are viable and able to mate at wild-type levels. In addition we constructed the $\Delta Klgpa1 \Delta Klgpa2$ mutant. Disruption of both *Ga* alleles was done in a homozygous *ura3/ura3 hisA/hisA* diploid with the *Klgpa1::Ura3* and *Klgpa2::His3* cassettes. Disruption was further confirmed by Southern blot analysis, and the lack of their messengers was confirmed by Northern blotting. The double-mutant diploid was then transferred to sporulation medium, and 10 tetrads were dissected. A first observation was that sporulation of the double mutant was deficient compared with that of wild-type cells and with that of the $\Delta Klgpa2$ strain, i.e., wild-type cells and the mutant lacking KIGpa2p yielded four viable spores. Sporulation of the double mutant was deficient, and in most cases only three spores were able to grow. The inviable spores had either a $\Delta gpa1$ or $\Delta gpa1 \Delta gpa2$ genotype. This result may suggest that the product of *KIGpa1* is necessary for proper sporulation of diploid cells. Auxotrophic markers were tested in haploid segregants, and surprisingly clones having both *Ura*⁺ and *His*⁺ alleles were obtained. This striking result indicates that the $\Delta Klgpa1 \Delta Klgpa2$ double mutant is viable (Fig. 4). In this double mutant the sterility impairment observed in the $\Delta Klgpa1$ strain persisted (Fig. 4). Double-mutant cells carrying the *KIGpa1* gene under the control of its own promoter grew normally and were able to mate (not shown), which indicates that KIGpa1p is required to trigger the pheromone response pathway in *K. lactis*.

All these observations suggest that KIGpa1p has a positive role in mating and that its activation by a pheromone via a receptor (if this is the case) is a required step for conjugation. In *S. cerevisiae* cells, constitutive activation of Gpa1p, achieved by replacing asparagine 388 with lysine, induces growth arrest and morphology defects in the absence of a pheromone (15). We tested the effect that the equivalent constitutively active *KIGpa1* allele, i.e., *KIGpa1p(K³⁶⁴)* (Fig. 1), has in the mating properties of *K. lactis*, by transfecting both wild-type and

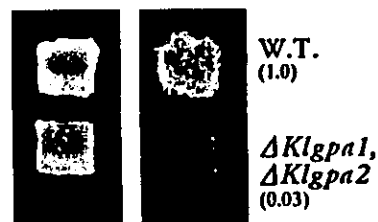


FIG. 4. The wild type (W.T.) and the $\Delta Klgpa1 \Delta Klgpa2$ double mutant were grown and mated as indicated for Fig. 2. (Right) Growth on YPD medium. (Left) Diploids grown on SD selective medium. Mating efficiencies (in parentheses) were calculated as indicated for Fig. 2A.

$\Delta Klgpa1$ cells. Figure 5 shows that, rather than bypassing the pheromone requirement for mating, KIGpa1p(K³⁶⁴) reduces mating in wild-type cells and is unable to restore the mating competence of the $\Delta Klgpa1$ mutant. Cells expressing the constitutively active *KIGpa1* allele are still viable and do not have a significantly different doubling time.

Finally we tested the effects that expression of both KIGpa1p and KIGpa2p have on the mating response pathway of *S. cerevisiae*. While no significant effect was observed in a qualitative experiment of diploid formation, i.e., *S. cerevisiae* cells carrying either *KIGpa1* or *KIGpa2* mate normally, we observed a weak effect of KIGpa1p on the expression of *Fus1* measured with the *Fus1-LacZ* fusion (21). Wild-type cells expressing *KIGpa1* in a multicopy plasmid show 1.5-times-lower β -galactosidase activity than cells carrying the vector alone. Although in vivo KIGpa1p does not seem to rescue *S. cerevisiae* $\Delta gpa1$ cells from lethality, we were able to observe the association between KIGpa1p and the Ste4p (G β) subunit using the two-hybrid assay (data not shown). Indeed, association experiments indicated that KIGpa1p has an interaction that is almost 20% that of the cognate Gpa1p-Ste4p association. KIGpa2p fails to show any association with Ste4p in these assays.

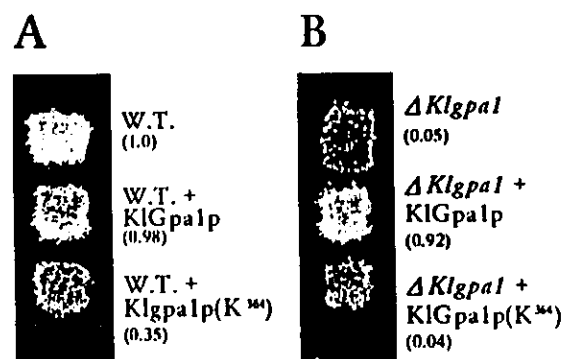
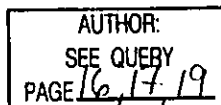


FIG. 5. Wild-type (W.T.) and $\Delta Klgpa1$ strains transfected with vector alone, vector plus *KIGpa1*, or vector plus *KIGpa1p(K³⁶⁴)* were grown (A) and mated (B) as indicated for Fig. 2. Diploids were selected on SD medium. Mating efficiencies (in parentheses) were calculated as indicated for Fig. 2A.



DISCUSSION

We have isolated the *K. lactis* Gpa1 gene, which encodes a heterotrimeric G α subunit homologue. The deduced primary structure of the protein predicts similarities with G α subunits from different species of yeast. In fact it shows, depending on the exact alignment, 72% similarity and 64% identity with its *S. cerevisiae* counterpart.

The functional role of KIGpa1p was inferred from genetic studies of a *KlGpa1*-disrupted strain. Disruption of the *KlGpa1* allele resulted in haploid viable cells with a strong deficiency in mating. In contrast, Gpa1p from *S. cerevisiae* has a negative role in the pheromone response pathway, i.e., disruption of the associated gene causes arrested cells in G₁ phase with a transient ability to mate, while its overexpression reduces the pheromone response and mating. Therefore, *K. lactis* seems to be the first example of budding yeast where Gpa1p is a positive element in the mating pathway. G α subunits playing positive roles in mating have been described in other yeasts: Gpa1p and Gpa3p in the basidiomycetes *Cryptococcus neoformans* (1, 27) and *Ustilago maydis* (23), respectively, and Gpa1p in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (20).

In *S. cerevisiae* cells, the G $\beta\gamma$ dimer transmits a pheromone signal to downstream elements to facilitate mating (5, 29). If parallelism can be drawn between the *K. lactis* and *S. cerevisiae* mating pathways, the mating inhibition effect of KIGpa2p could come from its interaction with the G $\beta\gamma$ dimer. In fact $\Delta KlGpa1$ cells, although sterile, show a weak ability to mate (Fig. 2), which indicates that other gene products (e.g., G $\beta\gamma$) are participating in the mating pathway. In this model of cooperative KIGpa1p and G $\beta\gamma$ signaling, activation of KIGpa1p by artificial means [i.e., KIGpa1p(K³⁶⁴)] should bypass the pheromone requirement and cells should increase mating. In fact the opposite is true, i.e., the activated form of KIGpa1p (GTP bound) does not rescue $\Delta KlGpa1$ cells from sterility and also reduces the mating of wild-type cells (Fig. 5). This indicates that the real situation is more complex and suggests that mating depends on a delicate balance of active and inactive forms of G α . The hypothesis that points to a cooperative role for G $\beta\gamma$ in mating remains to be proved, especially since the identified G β subunit in *S. pombe* may play an inhibitory role in mating as described previously (13) and/or could be involved in the regulation of adenylate cyclase in response to glucose detection (16). In fact, we have identified the putative *KlSte4* gene (unpublished results), which encodes a protein with 48% identity to ScSte4p. Unlike the G β subunit of *S. pombe* (13, 16), KlSte4p contains the amino-terminal coiled-coil structure found in ScSte4p, which indicates that this protein has the potentiality to associate to a G γ subunit. Therefore, it becomes essential to investigate the putative role that the G β subunit may play in the pheromone response pathway of *K. lactis*. Failure of cells expressing the KIGpa1p(K³⁶⁴) subunit to enter into growth arrest and induce mating may serve as a useful screen to identify the putative positive effector of KIGpa1p.

K. lactis has at least two G protein α subunits that are involved in two different pathways. While KIGpa1p participates in the mating pathway, KIGpa2 is implicated in regulation of the adenylate cyclase (25) and, as we showed here, is able to partially interfere with mating. These data suggest cross talk between these two proteins and, although we have not inves-

tigated a possible role of KIGpa1p in cAMP regulation, a relationship between cAMP and mating signaling pathways may exist. In fact, it has been shown that, in *S. cerevisiae* cells, the α pheromone suppresses glucose-stimulated cAMP formation (2). This effect is dependent on the Ste2 receptor and the Ste4p subunit and may involve the G α subunit encoded by the *Gpa2* gene (22).

Although KIGpa1p from *K. lactis* is structurally colinear and shows high similarity with its *S. cerevisiae* counterpart, it plays a divergent role. In fact, it is unable to functionally replace Gpa1p, which, in *S. cerevisiae*, connects the pheromone stimulus with the mating response. It may be that, although KIGpa1p may interact with Ste4p, as seen in the association experiments, it cannot be activated by the pheromone-bound receptor.

The results here described point to the model in which, in *K. lactis*, Gpa1p functions as a positive factor that transmits the signal from a pheromone receptor to a downstream effector(s). In this respect the KIGpa1p subunit is equivalent to G α subunits from other yeast species and even to mammalian subunits, which places the Gpa1p of *S. cerevisiae* in the special context of metazoan G α subunits.

Besides the evolutionary relationship between these budding yeasts and the similarities that they share in sexual reproduction, it seems that they have developed divergent mechanisms for pursuing the same goal, i.e., mating of haploid cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants 22591PN and 28015N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, and grant 102369 from PAEP, UNAM, to A.L.S.-T.

We are grateful to Gerardo Coello and Ana M. Escalante for sequence analysis of KIGpa1. We acknowledge the technical assistance of Soledad Guevara. We are grateful to Marcela Sosa and Guadalupe Codiz (staff of the Molecular Biology Facilities at the IFC) for assistance.

REFERENCES

- Alspaugh, J. A., J. R. Perfect, and J. Heitman. 1997. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein α subunit Gpa1 and cAMP. *Genes Dev.* 11:3206-3217.
- Arkininstall, S. J., S. G. Pappasavva, and M. A. Payton. 1991. Yeast α -mating factor receptor-linked G-protein signal transduction suppresses *Ras*-dependent activity. *FEBS Lett.* 284:123-128.
- Brake, A., B. Irvine, F. Maslarsz, and K. Shultz. 1988. Structure of genes encoding precursors of two *Kluyveromyces lactis* transported proteins. *Yeast* 4:S436.
- Cheol-Won, Y., H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto, and H. Kumagai. 1997. G-protein coupled receptor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:287-292.
- Cole, G. M., D. E. Stone, and S. I. Reed. 1990. Stoichiometry of G protein subunits affects the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 10:510-517.
- Dietzel, C., and J. Kurjan. 1987. The yeast SCG1 gene: a G α -like protein implicated in the α - and α -factor response pathway. *Cell* 50:1001-1010.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.
- Herman, A., and H. Roman. 1966. Allele specific determinants of homothaliamism in *Saccharomyces lactis*. *Genetics* 53:727-740.
- Herskowitz, I. 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187-197.
- Hilli, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tzagoloff. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2:163-167.
- Johnson, D. R., R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, and J. L. Gordon. 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63:869-914.
- Johnson, G. L., H. R. Kaslow, and H. R. Bourne. 1978. Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 253:7120-7123.
- Kim, D.-U., S.-K. Park, K.-Y. Chung, M.-U. Chol, H.-S. Yoo. 1996. The G

- protein β subunit Gpb1 of *Schizosaccharomyces pombe* is a negative regulator of sexual development. *Mol. Gen. Genet.* 252:20-32.
14. Kübler, E., H.-U. Mösch, S. Rupp, and M. P. Lisanti. 1997. Gpa2p, a G-protein α -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272:20321-20323.
 15. Kurjan, J., J. P. Hirsch, and C. Dietzel. 1991. Mutations in the guanine nucleotide-binding domains of a yeast G α protein confer a constitutive or uninducible state to the pheromone response pathway. *Genes Dev.* 5:475-483.
 16. Landry, S., M. T. Pettit, E. Apollinaro, and C. S. Hoffman. 2000. The fission yeast *glt5* gene encodes a G β subunit required for glucose-triggered adenylyl cyclase activation. *Genetics* 154:1463-1471.
 17. Leberer, E., D. Y. Thomas, and M. Whiteway. 1997. Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:59-66.
 18. Miranda, M., L. Ongay-Larios, S. Guevara, J. Ramirez, A. Peña, and R. Coria. 1995. Nucleotide sequence and chromosomal localization of the gene encoding the old yellow enzyme from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 11:459-465.
 19. Nakafuku, M., T. Obara, K. Kalbuchi, I. Miyajima, A. Miyajima, H. Itoh, S. Nakamura, K. I. Arai, K. Matsumoto, and Y. Kaziro. 1988. Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (Gpa2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1374-1378.
 20. Obara, T., M. Nakafuku, M. Yamamoto, and Y. Kaziro. 1991. Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein α subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5877-5881.
 21. Ongay-Larios, L., A. Saviñón-Tejeda, M. J. Williamson, Jr., M. J. Durán-Avelar, and R. Coria. 2000. The *Leu-132* of the Ste4(G β) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 α factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett.* 467:22-26.
 22. Papanavvas, S. G., S. Arkinstall, J. Reid, and M. Payton. 1992. Yeast α -mating factor receptor and G-protein-linked adenylyl cyclase inhibition requires RAS2 and GPA2 activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:1378-1385.
 23. Regenfelder, E., T. Spellig, A. Hartmann, S. Lauenstein, M. Bötker, and R. Kahmann. 1996. G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* 16:1934-1942.
 24. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
 25. Saviñón-Tejeda, A., L. Ongay-Larios, J. Ramirez, and R. Coria. 1996. Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 12:1125-1133.
 26. Sherman, F., G. R. Fink, and J. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
 27. Tolkacheva, T., P. McNamara, E. Piekarz, and W. Courchesne. 1994. Cloning of a *Cryptococcus neoformans* gene, GPA1, encoding a G-protein α -subunit homolog. *Infect. Immun.* 62:2849-2856.
 28. Wesołowski-Louvel, M., K. D. Breunig, and H. Fukuhara. 1996. *Kluyveromyces lactis*: genetics, biochemistry, and molecular biology of non-conventional yeast. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
 29. Whiteway, M., L. Hougan, D. Dignard, D. Y. Thomas, L. Bell, G. C. Saari, F. J. Grant, P. O'Hara, and V. L. MacKay. 1989. The Ste4 and Ste18 genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* 56:467-477.
 30. Xue, Y., M. Battle, and J. P. Hirsch. 1998. *Gpr1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G α subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* 17:1996-2007.
 31. Yuan, Y. O., I. L. Stroke, and S. Fields. 1993. Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the $\alpha 1$ and Ste12 proteins. *Genes Dev.* 7:1584-1597.

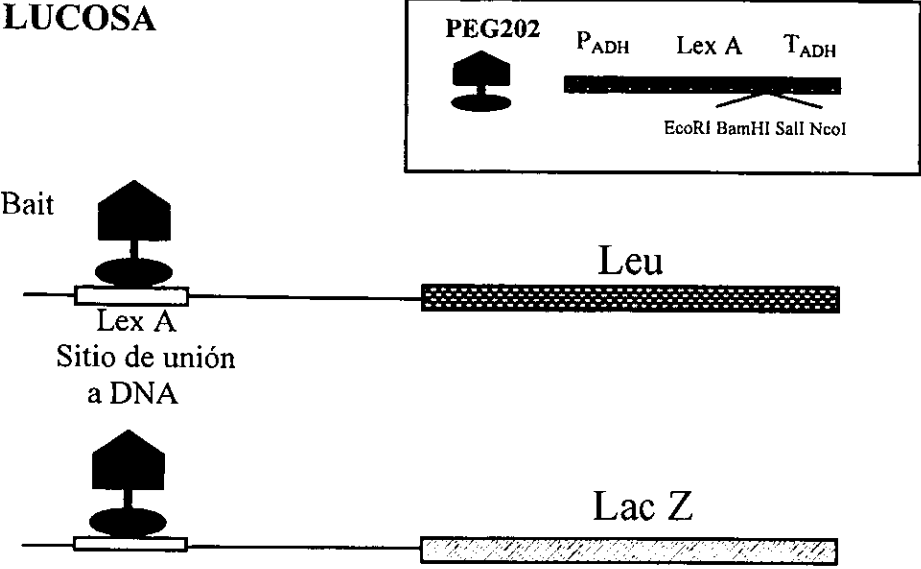
Sección IV.2 Ensayos de interacción entre las subunidades $G\alpha$ y la subunidad $G\beta$ en *K. lactis*

Dentro de los diversos campos de estudio dedicados a las proteínas G se encuentra la identificación de los residuos involucrados en la asociación entre subunidades. Esta línea de investigación es importante para definir la especificidad de la interacción entre las muy diversas subunidades $G\alpha$ y $G\beta$. La cristalización de un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$ de mamífero (Lambright, 1996) ha permitido identificar algunas de las regiones y residuos específicos de interacción (figura 4). La genética ha sido otra herramienta empleada para definir interacciones moleculares; de esta manera, antes de conocerse la estructura cristalina de las proteínas, los análisis genéticos mostraron que el extremo amino terminal de las subunidades α era importante para la unión con $\beta\gamma$ (Denker *et al*, 1992) y, en análisis más detallados, se han logrado identificar residuos específicos de interacción de estas subunidades (Conklin y Bourne, 1993, Whiteway *et al*, 1994). Utilizando el sistema del doble híbrido (Fields y Song, 1989, figura 10) realizamos un análisis general de la interacción de las subunidades α , KlGpa1p y KlGpa2p, y β , KlSte4p, de *K. lactis*. La figura 11 muestra los resultados de la determinación de β -galactosidasa (ver anexo 1). Estos resultados muestran que la interacción entre KlGpa1p y KlSte4p, es aproximadamente 15 veces mayor a la que existe entre KlGpa2p y KlSte4p. Por otra parte, la figura 12 muestra los datos de los ensayos de interacción de subunidades heterólogas, esto es, las subunidades α de *K. lactis* con la subunidad β de *S. cerevisiae*, y viceversa. Los datos muestran que la subunidad Gpa1p de *S. cerevisiae* es capaz de interactuar con Ste4p y con Klste4p de manera similar, mientras que con las subunidades $G\alpha$ de *K. lactis* se repite el fenómeno observado: KlGpa1p es capaz de unirse a Ste4p, aunque con menor fuerza a la observada en el ensayo con la subunidad β homóloga, y la magnitud de esta interacción es aproximadamente 5 veces mayor a la que existe entre KlGpa2p y Ste4p. Sin embargo, como hemos reportado, esta interacción no es suficiente para que KlGpa1p rescate una mutante letal $\Delta Gpa1$, ni la expresión de Gpa1p restablece la capacidad de apareamiento a una mutante $\Delta KlGpa1$.

La resolución de la estructura cristalina de las subunidades α y $\beta\gamma$, por separado (Noel *et al*, 1993, Sondek *et al*, 1996) y formando el heterotrímero (Wall *et al*, 1995, Lambright *et al*, 1996, figura 5), permitió conocer en detalle las áreas de interacción de estas subunidades. Como previamente se había establecido (Denker *et al*, 1992), el extremo amino de la subunidad α es una región importante para la interacción con $\beta\gamma$, principalmente los primeros 25 aminoácidos y en especial cinco aminoácidos ubicados en esta región (figura 4). Existe otra región extensa de interacción que involucra residuos de, o adyacentes a, las regiones de switch I y II (figura 4). Comparando las secuencias deducidas de aminoácidos de las subunidades α de *S. cerevisiae* y *K. lactis* utilizadas en los ensayos de interacción, podemos observar que entre Gpa1p y KlGpa1p la mayoría de los residuos importantes para la interacción con $\beta\gamma$ son idénticos, lo que no sucede con KlGpa2, en donde los cambios no son ni siquiera conservados (figura 14), aunque al parecer la estructura sigue siendo básicamente la misma para las tres. Estos cambios podrían explicar en parte los resultados obtenidos en los ensayos de interacción, pero sería importante realizar un análisis de los residuos de la subunidad β involucrados para concluir en detalle.

Por otra parte, se sabe que la modificación postraduccional por adición de ácido mirístico que sufren algunas subunidades α (el grupo G_o y algunas del tipo G_i) aumenta su afinidad por $\beta\gamma$ (Jones *et al*, 1990). Tanto Gpa1p como KlGpa1p contienen la secuencia consenso reportada para la unión

GLUCOSA



GALACTOSA

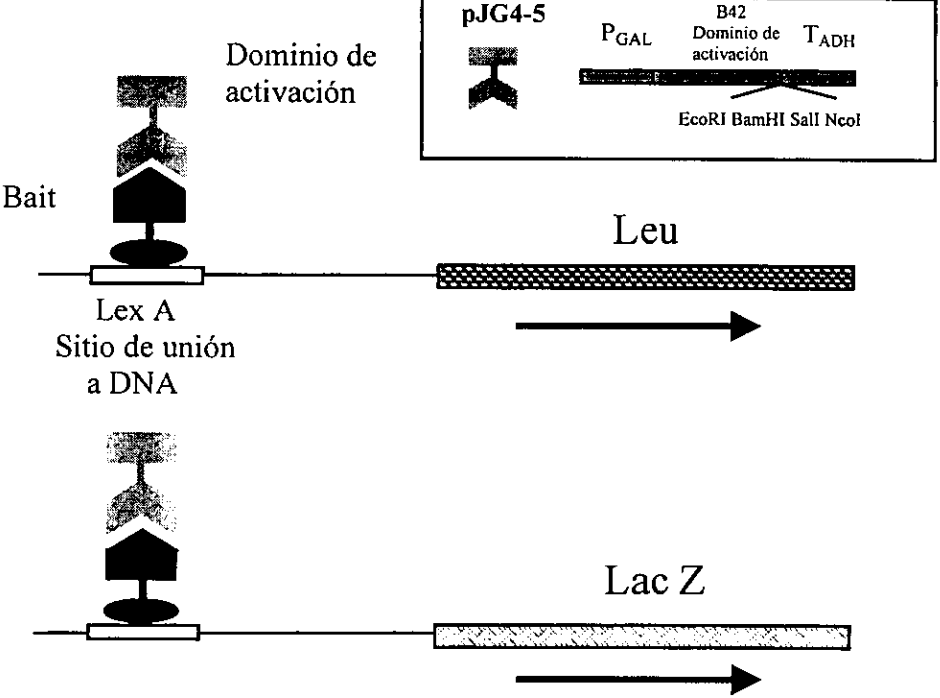
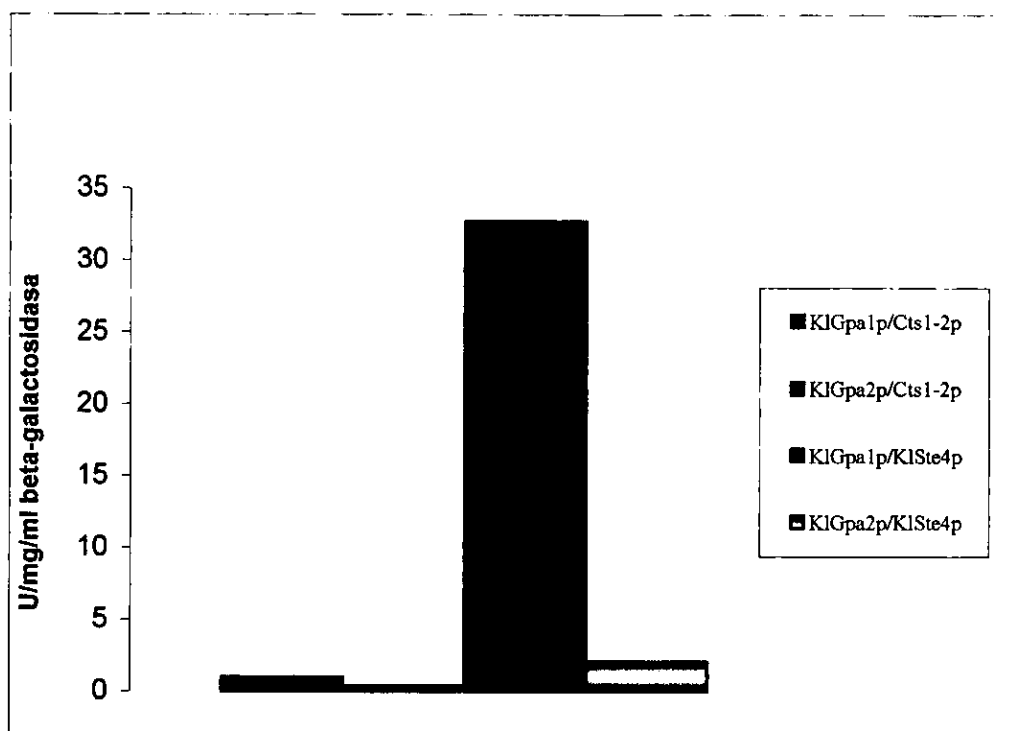


Figura 10. Sistema del doble híbrido. (Fields y Song, 1989)



<i>Dominio de unión a DNA</i>	<i>Dominio de activación</i>	<i>Actividad de β-galactosidasa U/mg/ml</i>
KI Gpa1p	Cts1-2p	0.57
KI Gpa2p	Cts1-2p	0.38
KI Gpa1p	KISte4p	32.74
KI Gpa2p	KISte4p	2.06

Figura 11. Ensayos de interacción entre las subunidades $G\alpha$, KI Gpa1p y KI Gpa2p, y la subunidad β , KISte4p, de *K. lactis*. Cts 1-2p corresponde a la endoquitinasa de *S. cerevisiae*, utilizada como control negativo de interacción. La actividad de β -galactosidasa corresponde al promedio de tres ensayos independientes

<i>KlGpa2</i>MTGISQALALNDSGVNGFDTDLAKRNGTVNASGGQS...FGSETVNALKVLLLG	52
<i>ScGpa1</i>MGCTVSTQTIGDESDPFLQNKRANDVLEQSLQIEKQRDKNEIKLLLLG	48
<i>KlGpa1</i>MGCVASTGNYENEDDFFIQNKRANDLLEQNLQGERNKNKNEVKLLLLG	48
<i>KlGpa2</i>	SGESGKSTVLQQLKILHQNGFSREELLEYPFIFDNI IETGKDLAKARRTFNVQLEED..	110
<i>ScGpa1</i>	AGESGKSTVLKQLKLLHQGGFSHQERLQYAQVIWADAIQSMKILIIQARKLGIQLDCD..	106
<i>KlGpa1</i>	AGESGKSTVLKQMKLLHQGGFTHRERMQYQVIWADAIESMRTLILQAGKLGIELDSDLK	108
<i>KlGpa2</i>AEISESLDELLSQYQPTKLPCL.....	134
<i>ScGpa1</i>DPINNKDLFACKRILLKAKALDYINASVAGGSDFLNDYVLKYSERYETRRRVQSTG	162
<i>KlGpa1</i>	NAHSGQLVNTLHQCKEKIFRANTLDQIDARIGGGSEFLNEYVLKYNGIGSKKKR.....	163
<i>KlGpa2</i>	
<i>ScGpa1</i>	RAKAAFDEDGNISNVKSDTDRDAETVTQNEADARNSSRINLQDICKDLNQEGLDQMFVR	222
<i>KlGpa1</i>	QTTLGFKESN.....GADPEEEDETDAFLSEKLAGTSYTGSSSETSELKRIDQS.....	211
<i>KlGpa2</i>PADLAKTLKILWNLQSTQDLLVSEHRSSFYLMDSASYFYENLDRI	179
<i>ScGpa1</i>	KTSREIQGQNRRLIHEDIKAKIKQLWNNDKGIKQC.FARSNEFQLEGSAAYYFDNIEKF	281
<i>KlGpa1</i>TNEEIAYAIKKLWTQDRGSDNV.SIGPSEFQLEGSASYFDNIEKF	256
<i>KlGpa2</i>	SEPKYIPTITDVIRTRKKTSGTFEDTMDLDKLNKIHFFDVGQQRSEERKKWTHCFDNTLI	239
<i>ScGpa1</i>	ASPNYVCTDEDILKGRIKTTCITIEEFNIGSS.KFKMLDAGGQRSEERKKWTHCFEGITAV	340
<i>KlGpa1</i>	ARVDYVCDMDILKVRIKTTCITIEENSFKIGPS.TEKMYDAGGQRSEERKKWTHCFEGITAV	315
<i>KlGpa2</i>	IFCVSLSEYDQTLLEDNSQNRLEESLILFDSVVNSRWFARSSVVLFLNKIDIFAEKLRHV	299
<i>ScGpa1</i>	LFVLAMSEYDQMLFEDERVNRMHESIMLFDTLNLSKWFKDTPFILFLNKIDLFEQVKVSM	400
<i>KlGpa1</i>	VFVIAISEYDQMLFEDERVNRMHESIVLLDTLNLSRWFANTPFILFLNKVDIFQEKVKRS	375
<i>KlGpa2</i>	PLEKYFPDYTG.GKDINKAAKYILWRFVQLNRANLNIYPHVTQATDTSNIKLVFAAIKET	358
<i>ScGpa1</i>	PIRKYFPDYQGRVGDAAEAGLKYFEKIFLSLNKTNKPIYVKRTCATDTQTMKFVLSAVTDL	460
<i>KlGpa1</i>	PIRTWFPNYPGKLGDSSETGLKYFESLFLSLNRSNKPIYVHRTCATDTQSMRFLGAVTDL	435
<i>KlGpa2</i>	ILENSLKDSGVL	370
<i>ScGpa1</i>	IIQQNLKKGII	472
<i>KlGpa1</i>	VIQQNLKKGIL	448

Figura 13. Comparación de las secuencias putativas de aminoácidos de las subunidades $G\alpha$ de *K. lactis* y *S. cerevisiae*: KlGpa1p, KlGpa2p y ScGpa1p. □ Residuos involucrados en la interacción con $\beta\gamma$ (según Lambright *et al*, 1996)

de este ácido graso (figura 1 del artículo Saviñón-Tejeda, 2000), lo que no ocurre con KlGpa2p, por lo que, si ésta última no es modificada, su unión al dímero $\beta\gamma$ podría ser débil.

Por último, considerando lo reportado para otros organismos, KlGpa1p podría ser la única subunidad α que forma un heterotrímero funcional con la subunidad $G\beta$ hasta ahora clonada en *K. lactis*: en *S. cerevisiae*, Gpa1p, la subunidad involucrada en la respuesta a feromonas de apareamiento, forma un heterotrímero con Ste4p/Ste18p; no se ha demostrado que la subunidad Gpa2p interactúe con este dímero, y en la secuencia completa del genoma de esta levadura no se han identificado nuevos genes de subunidades β o γ . De igual manera, en el caso de la levadura *S. pombe* sólo se conoce una subunidad β (no se han identificado subunidades γ) que participa en la activación de la adenilato ciclasa junto a la subunidad α Gpa2p, y que no parece interactuar con Gpa1p, la subunidad de la vía de respuesta a feromonas (Landry *et al*, 2000). El hecho de que una subunidad $G\alpha$ pueda regular una vía de señalización sin necesidad de formar un heterotrímero con β y γ es comparable al caso de las proteínas monoméricas denominadas GTPasas pequeñas, las cuales tienen una estructura y un modo de regulación similar al de una subunidad $G\alpha$ de proteína heterotrimérica, transmitiendo y regulando una señal a través de cambios conformacionales, intercambio de GDP por GTP, e hidrólisis de este último (Bourne *et al*, 1990).

V. Discusión general

El sistema de transducción que se activa en respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* se ha utilizado como modelo para establecer los mecanismos de funcionamiento y regulación de las proteínas G, por lo que a la fecha es uno de los procesos mejor caracterizados (Banuett, 1998). *S. cerevisiae* expresa dos subunidades $G\alpha$: Gpa1p (o Scg1p) involucrada en la respuesta a feromonas de apareamiento (Dietzel y Kurjan, 1987; Miyajima *et al*, 1987), y Gpa2p, la cual participa en el desarrollo pseudohifal a través de la regulación de los niveles de AMP cíclico (Lorenz *et al*, 1997).

En el presente trabajo hemos caracterizado dos subunidades $G\alpha$ en *K. lactis*, y aunque ambas son estructural y funcionalmente muy similares a sus homólogos de *S. cerevisiae*, la regulación de los procesos en que están involucradas es diferente. La subunidad KIGpa1p, al igual que Gpa1p, participa en la respuesta a las feromonas de apareamiento, pero mientras que en *S. cerevisiae* regula negativamente la vía, en *K. lactis* la subunidad α parece ser un elemento de control positivo en el proceso de transducción de la señal, ya que la mutación $\Delta KIGPA1$ disminuye, mas no elimina, la capacidad de apareamiento de la levadura. De esta manera, el sistema de respuesta a las feromonas de apareamiento de *K. lactis* se asemeja a las de otros hongos menos relacionados como *Schizosaccharomyces pombe* (Obara, 1991), *Cryptococcus neoformans* (Alspaugh, 1997) y *Ustilago maydis* (Regenfelder, 1997), los cuales expresan subunidades $G\alpha$ que regulan positivamente el proceso de apareamiento, aunque *K. lactis* parece ser el primer ejemplo entre las levaduras que se reproduce por gemación que presenta este tipo de regulación. Una mutante constitutivamente activa no restablece la respuesta de la $\Delta KIGpa1$, por el contrario, disminuye la habilidad para aparearse de una cepa silvestre. Lo anterior podría indicar que existen otros elementos involucrados en la activación de la vía, como la subunidad β , cuya participación activa en concertación con la subunidad α ya ha sido sugerida en otros procesos (Landry, 2000). En el laboratorio se ha clonado un gen correspondiente a una subunidad $G\beta$ de *K. lactis*. Mutantes que no expresan este gen al parecer son estériles. Lo anterior sugiere que el proceso de apareamiento en respuesta a feromonas en *K. lactis* efectivamente requiere de la acción de ambas subunidades, α y β .

Por otra parte, la subunidad KIGpa2p participa en la regulación de los niveles de AMP cíclico, y, aunque Gpa2p de *S. cerevisiae* tiene una función similar, esta última parece actuar en concertación con la proteína Ras2 (Kübler, 1997), mientras que en *K. lactis* no se han sido identificado proteínas del tipo Ras y la disminución de los niveles de AMP cíclico se debe únicamente a la mutación $\Delta KIGPA2$. Adicionalmente, en *K. lactis* los procesos de apareamiento y regulación del AMP cíclico parecen estar interrelacionados, ya que la sobre expresión de *KIGPA2* disminuye la capacidad para aparearse de una cepa silvestre. En *S. pombe* y *C. neoformans* el proceso de conjugación se lleva a cabo bajo condiciones de privación de nitrógeno; en este último y en *U. maydis* la subunidad $G\alpha$ que participa en la respuesta a feromonas de apareamiento parece también estar involucrada en la regulación de los niveles de AMP cíclico (Regenfelder, 1997; Alspaugh, 1997), por lo que resulta interesante investigar el efecto de los nutrientes en el proceso de conjugación de *K. lactis*, y determinar si los factores que activan la vía de KIGpa2p se relacionan con el proceso de apareamiento y la actividad de KIGpa1p.

Los ensayos del doble híbrido entre las subunidades α y β de *K. lactis* mostraron que la interacción de β con KlGpa1p era mucho más fuerte que con KlGpa2p. En *S. cerevisiae* sólo la subunidad α involucrada en la respuesta a feromonas, Gpa1p, interactúa con Ste4p (β) y Ste18p (γ), formando un heterotrímero; la subunidad Gpa2p parece funcionar en ausencia de un dímero $\beta\gamma$ correspondiente. De igual manera, en *S. pombe*, al parecer la única subunidad G β identificada, actúa al lado de la subunidad α involucrada en la regulación de la adenilato ciclasa; no se ha identificado la subunidad β que interactúa con la G α que participa en la conjugación, ni subunidades G γ . Con base en lo anterior, en *K. lactis* la única subunidad G β hasta el momento clonada, al parecer interactúa y actúa únicamente con KlGpa1p en la respuesta a feromonas de apareamiento, aunque cabe la posibilidad de que ambas subunidades G α desarrollen su función sin necesidad de formar un heterotrímero.

Los datos anteriores nos permiten plantear un modelo sobre la regulación de las vías mediadas por proteínas G en *K. lactis* (figura 14). KlGpa1p es el elemento positivo de la cascada de señales en respuesta a feromonas de apareamiento, i.e. es la subunidad que transduce la señal, pero al parecer el proceso completo que prepara a la levadura para la conjugación requiere la acción de la subunidad β (KlSte4p), y también requiere la señal transmitida por la otra subunidad G α , KlGpa2p, la cual sensa la condición de nutrientes en el medio. Aún no sabemos a que nivel de la cascada podrían actuar KlSte4p y KlGpa2p, y si KlGpa1p y KlGpa2p comparten la subunidad β .

Nuestros resultados muestran que la regulación de las vías mediadas por proteínas G en *K. lactis* se parece a la reportada en otras especies de levadura, diferentes a *S. cerevisiae*. El tipo de regulación que presenta *K. lactis* es inclusive análoga a la de las subunidades de la familia G α s de mamífero. Lo anterior permite distinguir la situación de *Kluyveromyces lactis* como modelo alternativo en el estudio de los sistemas de transducción de señales. Por una parte, es un organismo fácilmente manipulable molecular y genéticamente, con el que funcionan la mayor parte de los métodos que han sido desarrollados para *S. cerevisiae* y otros organismos relacionados. Por otro lado, posee ventajas únicas como lo es la propiedad de degradar eficientemente una gran cantidad de sustratos y la habilidad excepcional para expresar genes heterólogos. Estos dos puntos, aunados al hecho de que sus sistemas sean más parecidos a los de organismos superiores, permitirá que *K. lactis* sea utilizada como modelo para ayudar a esclarecer los mecanismos de regulación de los sistemas de transducción de señales en eucariontes. Adicionalmente, su importancia biotecnológica puede ser incrementada si se conocen los mecanismos de regulación de las proteínas que son producidas por esta levadura.

Otro punto de interés derivado de este trabajo, es la relación evolutiva que guardan los organismos eucariontes conocidos. De acuerdo a los resultados, la línea de evolución seguida por *S. cerevisiae* parece ser única. Aún un organismo que comparte con *S. cerevisiae* varias características fisiológicas generales, como lo es *K. lactis*, en lo que a regulación detallada de procesos se refiere es más parecida a otras especies. De esta manera, parece ser que *S. cerevisiae*, el modelo que se ha tomado como representación de los eucariontes inferiores que precedieron el camino en la evolución de especies superiores, no es el más representativo. Por lo tanto, es importante conocer y estudiar otros organismos cercanos y lejanos filogenéticamente a *S. cerevisiae*, pues esto permitirá definir más claramente el proceso evolutivo de los eucariontes.

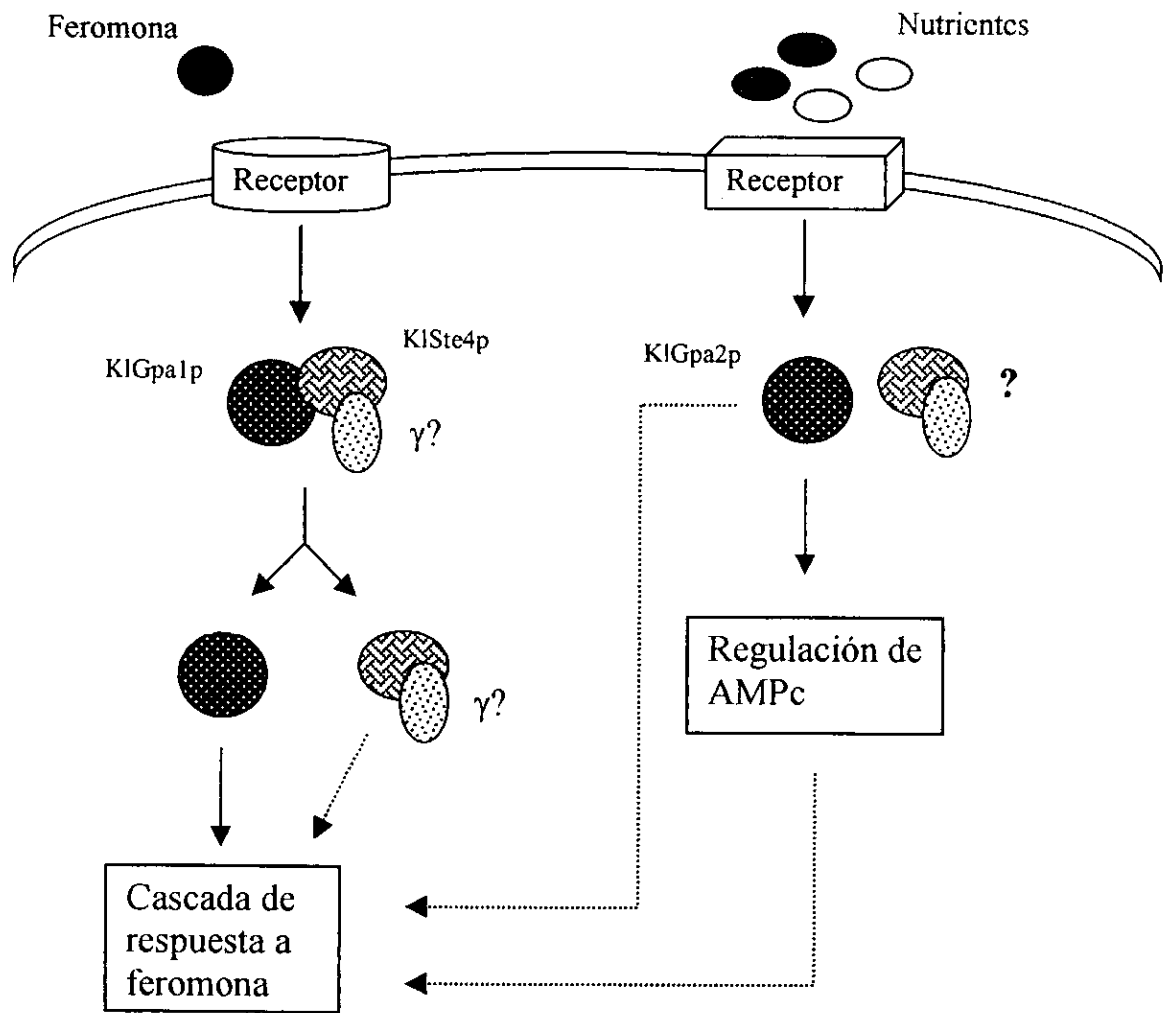
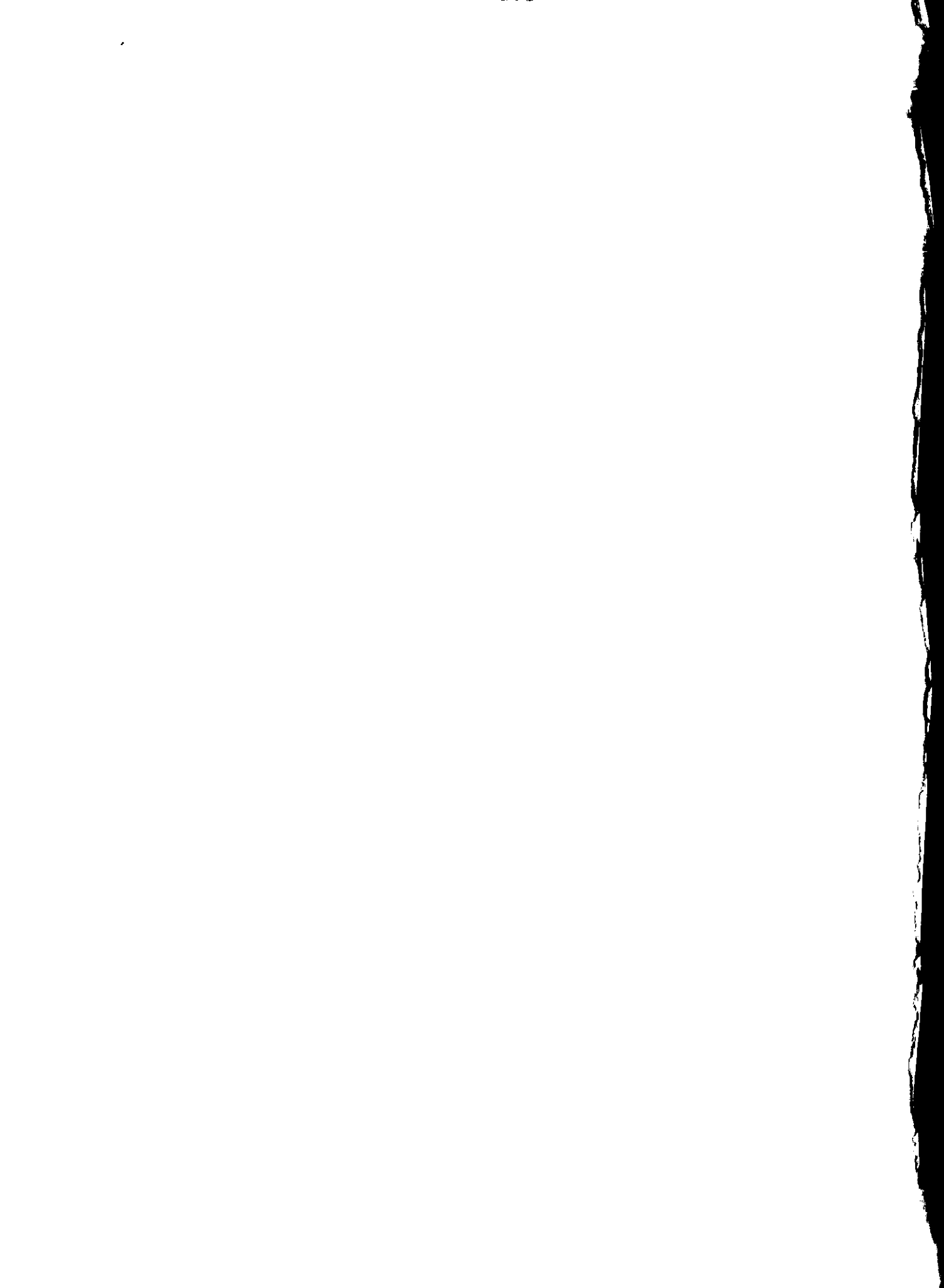


Figura 14. Modelo de regulación de las vías de transducción de señales mediadas por proteínas G en *Kluyveromyces lactis*.

VI. Perspectivas

El presente trabajo es apenas el comienzo del proyecto global de caracterización de los sistemas de transducción de señales en *Kluyveromyces lactis*, pues los datos aportados únicamente explican, y de manera parcial, lo que ocurre a nivel de las proteínas G. Por lo tanto, es importante continuar no sólo con la caracterización de los elementos que componen estas proteínas, determinando su función específica y la relación entre ellos, sino extender el análisis a diferentes elementos que actúan al mismo nivel, y a otros que participan cascada arriba (i.e. receptores) y cascada abajo (i.e. efectores), lo que permitirá definir la regulación concertada de estos procesos en *K. lactis*.



VII. Anexo A. Artículo: Alma L. Saviñón-Tejeda, Laura Ongay-Larios, Jorge Ramírez and Roberto coria. (1996) Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **12**, 1125-1133.

Isolation of a Gene Encoding a G Protein α Subunit Involved in the Regulation of cAMP Levels in the Yeast *Kluyveromyces lactis*

ALMA L. SAVIÑÓN-TEJEDA, LAURA ONGAY-LARIOS, JORGE RAMÍREZ AND ROBERTO CORIA*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F. México

Received 26 January 1996; accepted 5 March 1996

Using chromosomal DNA from *Kluyveromyces lactis* as template and oligodeoxynucleotides designed from conserved regions of various G protein alpha subunits we were able to amplify by the polymerase chain reaction two products of approximately 0.5 kb (P-1) and 0.8 kb (P-2). Sequencing showed that these two fragments share high homology with genes coding for the G α subunits from different sources. Using the P-1 fragment as a probe we screened a genomic library from *K. lactis* and we cloned a gene (*KIGPA2*) whose deduced amino acid sequence showed, depending on the exact alignment, 62% similarity and 38% identity with Gpa1p and 76% similarity and 63% identity with Gpa2p, the G protein α subunits from *Saccharomyces cerevisiae*. *KIGPA2* is a single-copy gene and its disruption rendered viable cells with significantly reduced cAMP level, indicating that this G α subunit may be involved in regulating the adenylyl cyclase activity, rather than participating in the mating pheromone response pathway. KIGpa2p shares some structural similarities with members of the mammalian Gas family (stimulatory of adenylyl cyclase) including the absence in its N-terminus of a myristoyl-modification sequence. The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank data base (Accession No. L45105).

KEY WORDS — G proteins; α subunit; signal transduction; *Kluyveromyces lactis*; cAMP; yeast

INTRODUCTION

Mammalian signal transduction between seven transmembrane segment receptors and a variety of intracellular effectors, such as adenylyl cyclase, phospholipases and ion channels, is mediated by heterotrimeric G proteins composed of α , β and γ subunits (reviewed in Birnbaumer, 1992). Upon guanine nucleotide exchange the α subunit dissociates from the $\beta\gamma$ dimer and it is thought to confer receptor and effector specificity; however, it is now accepted that β and γ are also required for receptor interaction and can regulate effector function (reviewed in Tang and Gilman, 1992). G proteins are a complex and diverse set of highly homologous subunits. The most complex is that of the α subunit which can be divided into at least three different families (α_s , α_i and α_q), each divided into subfamilies. Molecular cloning has revealed the existence of at least 16 genes encoding α subunits.

Moreover, some of these genes have more than one product due to alternative RNA splicing (reviewed in Birnbaumer, 1990).

Signal transduction pathways mediated by heterotrimeric G proteins, have also been found in lower eukaryotes such as *Dictyostelium* (Pupillo *et al.*, 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Nakafuku *et al.*, 1987; Dietzel and Kurjan, 1987; Nakafuku *et al.*, 1988), *Schizosaccharomyces pombe* (Obara *et al.*, 1991; Isshiki *et al.*, 1992), *Candida albicans* (Sadhu *et al.*, 1992) and *Cryptococcus neoformans* (Tolkacheva *et al.*, 1994). To date, two different G α subunits have been identified in *S. cerevisiae* and were designated Gpa1p (also known as Scg1p; Dietzel and Kurjan, 1987; Nakafuku *et al.*, 1987) and Gpa2p (Nakafuku *et al.*, 1988); one G β (Ste4p) and one G γ (Ste18p) (Whiteway *et al.*, 1989). The heterotrimer Gpa1p/Ste4p/Ste18p is required for response to mating pheromones. Upon interaction of pheromones with their respective

*Corresponding author.

receptors, Ste2p for α pheromone in *Mata* cells and Ste3p for a pheromone in *Mata* cells, the G protein dissociates into Gpa1p(GTP) and the Ste4p/Ste18p dimer, which in turn initiates a cascade of events that result in transcriptional activation of genes, morphological changes, growth arrest in G1 phase and mating competence (reviewed in Kurjan, 1990). On the other hand, the role of *GPA2* is less clear because its disruption does not cause any distinguishable phenotype nor does its product complement the loss of Gpa1p in the mating response (Nakafuku *et al.*, 1988). Over-expression of Gpa2p, however, increases the level of cAMP in wild-type cells and can suppress a temperature-sensitive mutation of *RAS2* (Nakafuku *et al.*, 1988). Moreover, it seems that Gpa2p augments Ras-stimulated adenylyl cyclase activity and this facilitation is selectively sensitive to inhibition by α -mating factor (Papasavvas *et al.*, 1992).

G α subunits involved in yeast mating pathways have also been described in *C. albicans* (Sadhu *et al.*, 1992), *S. pombe* (Obara *et al.*, 1991) and *C. neoformans* (Tolkacheva *et al.*, 1994). However, a *S. cerevisiae* Gpa2p homolog involved in regulation of intracellular cAMP levels has only been described in the fission yeast (Isshiki *et al.*, 1992).

Nothing is known about the G protein-mediated transduction systems in *Kluyveromyces lactis*. We have taken advantage of the high level of similarity between subunits of the G proteins to clone by polymerase chain reaction (PCR) putative α subunit(s) from *K. lactis*. We here identified a gene whose product is involved in the regulation of cAMP in this yeast.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and media

Kluyveromyces lactis strains used in this study were: WM37 (NRRL Y-1140) (*Mata*, *his3*), MD2/1 (*Mata*, *argA*, *lysA*, *uraA*) (kindly provided by Dr H. Fukuhara). Strain 136 (*Mata*, *argA*, *his3*, *uraA*) is a segregant of the cross between WM37 and MD2/1, and strain 155 (*Mata*, *ade2*, *his3*, *uraA*) is a segregant of the cross between MD2/1 and KA5-6C (*Mata*, *ude2*, *his3*, *leu1*) of unknown origin (obtained from Dr A. Brunner). Homozygotic *uraA* diploids were freshly generated by crossing strain 136 with strain 155. *Escherichia coli* NM522 strain was used to propagate plasmids and to produce DNA for sequencing. KEp6 shuttle

vector (kindly provided by Dr H. Fukuhara) was used to transfect yeast cells. Chromosomal DNA from strain WM37 was purified to construct a genomic DNA library as described (Miranda *et al.*, 1995). YIp352 integrating vector carrying the *Ura3* gene was derived from YEp352 (Hill *et al.*, 1986) by removing the 2 μ replication origin and was used for gene disruption. pTZ18R phagemid was used to subclone DNA fragments for sequencing. YPD medium contained 1% yeast extract, 1% bacto peptone and 2% glucose. SD medium contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose and 25 μ g/ml of the required amino acids. LB medium supplemented with 50 μ g/ml ampicillin was used to grow recombinant bacteria.

Design of oligodeoxynucleotides and PCR amplification

Degenerate oligodeoxynucleotides were designed from regions corresponding to the highly conserved guanine nucleotide-binding and hydrolysis sites (Figure 1) which are common to the G α subunits from a variety of organisms: 5' T(ATCG) GG(ATCG) GC(ATCG) GG(ATCG) GA(AG) (TA)(CG)(ATCG) GG(ATCG) AA 3' was designed based on the sequence LGAGESGK and 5' CA (AG)TG (ATG)AT CCA (TC)TT (TC)TT (ATCG)C(GT) (TC)TC 3' was designed based on the sequence ERKKWIHC. Total DNA from the strain WM37 was used as template for amplification by PCR using the following conditions: 94°C 5 min, 50 cycles of 94°C 30 s, 45°C 45 s, and 72°C 60 s, and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were subcloned into the pCRTMII vector (InVitrogen) and sequenced fully.

cAMP determination

Yeast cells from wild-type WM37 and Δ *GPA2* strains were grown to late log phase in YPD medium, harvested, washed twice with water and incubated for 24 h in YPD medium containing 0.02% glucose. Cells were harvested, washed with water and suspended in 25 mM-MES-TEA buffer pH 6.0 at 50 mg cells/ml. 250 μ l of this suspension were stimulated with 100 mM-glucose for different times. Cells were treated with 16% trichloroacetic acid and frozen with liquid nitrogen. Samples were then neutralized by three extractions with water-saturated diethyl-ether, and dissolved in 50 μ l of 50 mM-Tris (pH 7.5), 4 mM-EDTA. AMP was determined using the radioassay kit provided by Amersham.

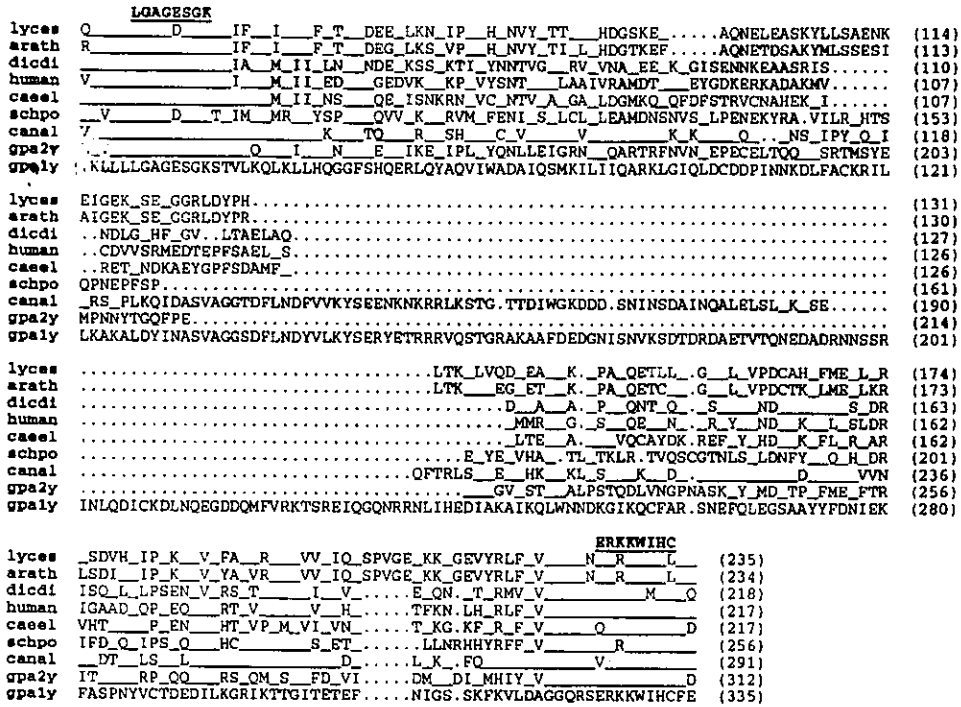


Figure 1. Alignment of amino acid sequences of $G\alpha$ subunits from a variety of organisms. -, amino acid identical to that in gpa1y; . gap; numbers are relative to position of residues in each protein. Amino acid sequences from which oligodeoxynucleotides for PCR were designed are bold-face and underlined. Lyces, Tgal subunit from *Lycopersicum esculentum*; arath, Gpa1p from *Arabidopsis thaliana*; dicdi, Gpa1p from *Dictyostelium discoideum*; human, $G\alpha_{1-2}$ from human; caeel, Gpa1p from *Caenorhabditis elegans*; schpo, Gpa1p from *Schizosaccharomyces pombe*; canal, Cag1p from *Candida albicans*; gpa2y, Gpa2p from *Saccharomyces cerevisiae*; gpa1y, Gpa1p from *S. cerevisiae*.

Chromosomal K1GPA2 disruption

The YIp352 integrative vector was derived from the YE_p352 plasmid (Hill *et al.*, 1986) by removing the 2 μ replication origin. An *Eco*RI fragment carrying the original PCR product was obtained from the pCRTMII clone and subcloned into the YIp352 digested with the same enzyme. The resulting plasmid was digested with *Bg*II, a naturally occurring site present in the *K1GPA2* open reading frame at positions 348, 408 and 478, to give rise to a linearized plasmid that carries 138 bp and 218 bp as recombinant ends. The linearized plasmid was then used to transfect a diploid strain (*Mata*, *Ade2lade2*, *ArgAlargA*, *his3lhis3*, *uraAluraA*) generated by crossing strain 136 with strain 155, selecting for *Ura*⁺ transformants. Gene disruption was confirmed by Southern blotting techniques.

Southern blot analysis

Chromosomal and plasmidic DNA blots were hybridized with a ³²P probe labelled with the

random primed system kit (Gibco, BRL). Blots were hybridized overnight at 42°C, and washed twice with 5 × SSC, 0.5% SDS; once with 1 × SSC, 0.1% SDS; and once with 2 × SSC. All washes were done at 42°C for 10 min.

Other methods

Yeast transformation was carried out either by the alkaline cation method (Ito *et al.*, 1983) or by the plate method (Elbe, 1992). Molecular biology procedures were performed as described by Sambrook *et al.* (1992). Standard yeast genetics procedures were done as described by Sherman *et al.* (1986). Sequencing was done by primer extension using the dideoxy-chain-termination reaction (Sanger *et al.*, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

The guanine nucleotide binding and hydrolysis domain of the G protein α subunit is highly

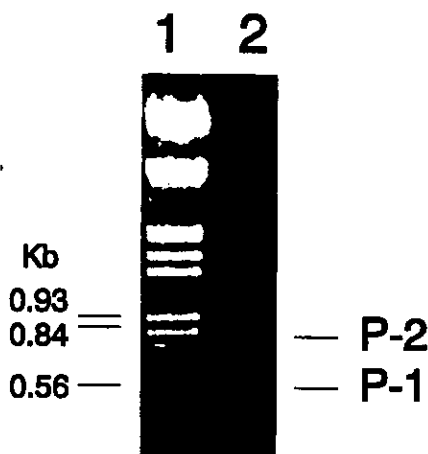


Figure 2. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel showing the products P-1 and P-2 obtained by PCR using chromosomal DNA from strain WM37 as template. Lane 1, MW marker (Lambda phage digested with *EcoRI-HindIII*); lane 2, PCR amplification products.

conserved among different species. This domain lies in several positions of the primary structure of the protein that are gathered in two regions known as G1 and G2. We designed two pairs of oligodeoxynucleotides corresponding to these regions (Figure 1) to amplify fragments of genes encoding putative α subunit(s) from *K. lactis* by means of PCR. The expected size of the PCR products according to the positions of the designed oligonucleotides should vary from approximately 530 bp, for the mammalian type α subunits, to 860 bp for the largest gene cloned so far (*GPA1* from *S. cerevisiae*). Genomic DNA from strain WM37 was amplified using the conditions described in Materials and Methods. We identified two products, corresponding to approximately 0.5 kb (P-1) and 0.8 kb (P-2) (Figure 2). These two fragments were gel purified and subcloned into the pCRTMII vector and sequenced fully in both directions. The nucleotide sequence showed fragments of 537 bp (P-1) and 777 bp (P-2) respectively and their predicted amino acid sequence (Figure 3) confirmed that these are related to G protein α subunits. A comparison of the amino acid sequence showed 60% similarity and 37% identity between these two products. Close analysis of the deduced amino acid sequences indicated that P-1 and P-2 PCR products could be fragments of the *GPA2* and the *GPA1* *S. cerevisiae* homolog genes respectively.

Using P-1 fragment as a probe, we screened a *K. lactis* genomic DNA library (from strain

```

P-1  SGESGKSTVLQQLKILHQNGFSREELLEYKPFYFDNIETGKDLAKARR
P-2  SGESGKSTVLKQKLLKQGGFTHRERMQYGVWADAKESMRTLILGAG

TFNVQLEEDAISESD.....LDELLSQQYQ
KLGIELSDLKNHSGQLVNTLHQCKEKIFRANTLDQIDARIGGGSEFLNEVV
.....LDELLSQQYQ
LKYNGIGSKKRQTTLGFRESNGADPEEDETDAFLSEKLAGTSYTGSSSETSEL

PTKLPCLPADLAKTLWNLQSTQDLLVSEHRSSFYLMDSASTFYENLDRISEPKY
KRLDQSTNEEYAYAWTQDRGSD.NVSIQPSFQLEGSASTYFDNIEKFAVDY

IPIITDVLIRTRKTKILSGIFDITMIDLKDKLKLHFFDVGGQRSEKRWIE 179
VCDDMDILKVKIKTKLGTITENSFKIGPS.RFKVYDAGGQRSEKRWIE 259

```

Figure 3. Amino acid sequence alignment of *K. lactis* PCR-amplified P-1 and P-2 fragments. Identical amino acids are bold-face. Gaps are represented by periods (.)

WM37) looking for the full-length gene (cloning of the gene related to the P-2 product will be described elsewhere). Four positive clones were selected and analyzed with a set of restriction enzymes showing similar patterns. The plasmid carrying the smaller insert (approximately 9 kb) was selected for further characterization. Southern blot analysis of this clone, using the PCR product as a probe, allowed the identification of a 1.9 kb *Sall-BamHI* fragment containing the complete ORF. This fragment was subcloned into the pTZ18R phagemid and sequenced fully. The nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence are shown in Figure 4. The complete gene spans 1113 base pairs (including the stop codon) and encodes a putative protein of 370 amino acids (starting with methionine).

A comparison of the deduced amino acid sequence with the GenBank and EMBL data bases revealed some degree of homology with the Gpa1p and Gpa2p subunits of the *S. cerevisiae* G proteins. According to the alignments shown in Figure 5, the overall homology is slightly more significant with Gpa2p (64% similarity and 40% identity) than with Gpa1p (62% similarity and 38% identity). If one excludes the extra amino-terminus from the *S. cerevisiae* Gpa2p subunit (first 75 amino acids), the homology with KlGpa2p goes up to 76% similarity and 63% identity, while removal of the internal extra domain from Gpa1p (from position 142 to 243) does not change the homology significantly. This finding strongly suggests that the cloned gene is the *K. lactis* version of *GPA2*.

Detailed analysis of the amino acid sequence of KlGpa2p shows an atypical G1 region of the guanine nucleotide binding and hydrolysis domain; GSGE (residues 52 to 55 in Figure 5) instead of the conserved GAGE found in most of the G α subunits. Substitutions of the conserved alanine in this region have been found only in some members of the mammalian α q family, in

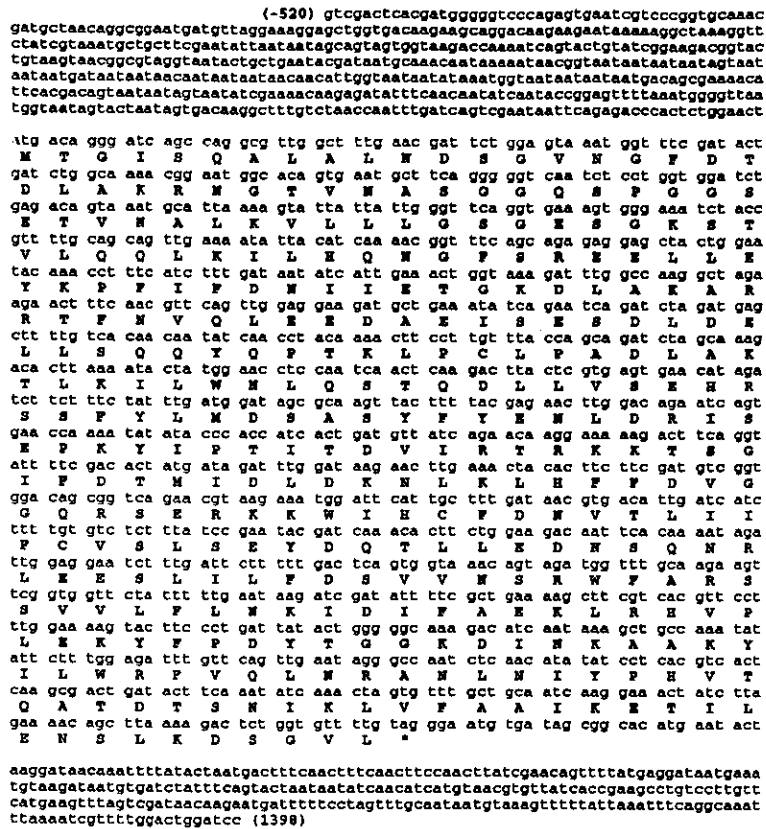


Figure 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Gpa2 from *Kluyveromyces lactis*. The sequence shown corresponds to the 1.9 kb *Sall-Bam*HI fragment.

the so-called αz subunit belonging to the αi family (reviewed in Birnbaumer, 1992; Simon *et al.*, 1991) and in the recently cloned *GPA1* from *C. neoformans* (Tolkacheva *et al.*, 1994). The functional role of specific mammalian α subunits cannot be deduced from their primary structure. Instead, one of the most effective tools for classifying α subunits is their sensitivity to the bacterial pertussis (Bokoch *et al.*, 1983; Codina *et al.*, 1983) and cholera (Johnson *et al.*, 1978) toxins. Thus, members of the *Gai* class are ADP-ribosylated by pertussis toxin, uncoupling the G protein from its receptor, while cholera toxin ADP-ribosylates the *Gas* type of subunits, inhibiting the GTPase activity (reviewed in Birnbaumer, 1990). The Gpa2 subunit from *K. lactis* does not show the cysteine residu near the carboxyl-terminus that has been identified as the site for ADP-ribosylation by pertussis toxin. It does, however, possess the arginine (position 193 in Figure 5)

that is ADP-ribosylated by cholera toxin. Based on this criteria it could be that *KlGpa2p* is functionally related to the *Gas* (stimulatory of adenylyl cyclase) type subunits. Some members of mammalian αi subunits, but not the *as* class of proteins, are N-myristoylated (Jones *et al.*, 1990; Mumby *et al.*, 1990). N-myristoylation is required for their association with membranes and for their high-affinity binding to the *G β* dimer. Likewise, *S. cerevisiae* *Gpa1p* is N-myristoylated and this modification is necessary for its efficient interaction with the *Ste4p/Ste18p* complex (Stone *et al.*, 1991). The amino-terminus of *KlGpa2p* presents the sequence *MXGXSXXX* (Figure 4) instead of *MGXXSXXX* that has been recognized as the target for N-myristoylation by N-myristoyl transferase (reviewed in Johnson *et al.*, 1994). This observation could mean that either *KlGpa2* is not N-myristoylated, which agrees with its putative functional similarity to

```

Gpa2 MGLCASSEKNGSTPDTQTASAGSDNVGKAKVPPKQEPQKTVRTVNTANQQEKQQQRQQQP 60
K1Gpa2 .....
Gpa1 .....

Gpa2 SPHNVKDRKEQNGSINNA--PTATA-T--SQIQINI-S-L-DRSS-VAAQP-LSDASSGSN 120
K1Gpa2 .....MTGISQALALNDSGVNGFDITLAKRNGTVNASSGGQS...PGGSET 42
Gpa1 .....MGCTVSTQTI-D...ES-PFLQ-KRA-DVIE--L.QLEKQRD 38

Gpa2 DKE-----A-----EQ-IK--I-L-YQ-LL-I-RN-IQ--TR 180
K1Gpa2 VNALKVLLLGSGESGKSTVLQQLKILHONGFSPRELLLEYKPFIFDNIITGKDLAKARRT 102
Gpa1 K-EI-L---A-----K---L---G---HQ-R-Q-AQV-WADA-QSM-I-IIQA-K 98

Gpa2 ---N--PEC-LTQQ--SRTM-YEMPNNYTGQF-E-I-GVIST-..... 223
K1Gpa2 FNVQLEDADAISESDDLDELLSQOYQPTKLPCLPADLAKTLKIL..... 145
Gpa1 LGI--DC-DP-NNK--FACKRILLKAKA-DYIN-SV-GGSDF-NDYVLKYSERVETRRRV 158

Gpa2 ..... 223
K1Gpa2 ..... 145
Gpa1 QSTGRAKAAFDDEGNI SNVKSDDTRDAETVTQNEADRNNSRINLQDICDLNQEEDDQ 218

Gpa2 .....-A-P-.....-VNGPNA-K-----TP--M--F 254
K1Gpa2 .....WNLQS.TQD..LLVSEHRSS.FYLMDSASYFYENL 176
Gpa1 MFVVRKTSREIQGNRRNLIHEDIAKAIK-LWNN-KGIKQCF--NE-Q-EG--A-YFD-I 278

Gpa2 T--TS-N-R--QQ-IL-S-QM-----V--MGSDI-M-IY----- 314
K1Gpa2 DRISEPKYIPTITDVIIRKRTKSGIFDTMIDLDKLNKLHFFDVGQQRSEKRWIHCFFNV 236
Gpa1 EKFA-S-N-VC-DE-ILKG-I--T--TE-EFNIGSS.-FKVL-A-----EGI 337

Gpa2 --V-----M--KN---FQ---V---NI-----T-----L----- 374
K1Gpa2 TLIIFCVSLSEYDQTLLEDNSQNRLEESLILFDSVVNSRWFARSVVFLNKKIDIFAEKL 296
Gpa1 -AVL-VLAM----M-F--ERV--MH--IM---TLL--K--KDTFFI-----L-E--V 397

Gpa2 -K--M-N-----S-----S-----R----- 433
K1Gpa2 RHVPLEKYFPDYTG.GKDINKAAKYILWRPVLNRRANLNYPHVTQATDTSNIRLVFAAI 355
Gpa1 KSM-IR-----Q-RVG-AEAGL--FEKI-LS--KT-KP--VKR-C----QTM-F-L-S-V 457

Gpa2 -----T-----Q 449
K1Gpa2 KETILENSLKDQSVL 370
Gpa1 TDL-IQQN--KI-II 472

```

Figure 5. Amino acid sequence alignments of Gpa2p from *K. lactis* and Gpa1p and Gpa2p from *S. cerevisiae*. The K1Gpa2p is shown in its full length. Dashes (-) and periods (.) represent identities and gaps, respectively. K1Gpa2 amino acids identical to at least one of the *S. cerevisiae* proteins are bold-face.

mammalian α s subunits, or that the N-myristoyl transferase recognizes the K1Gpa2p amino-terminus as a target for post-translational modification. It is worth noting that, in contrast to K1Gpa2p, Gpa2p from *S. cerevisiae* contains the potential amino-terminus sequence for N-myristoylation (Nakafuku *et al.*, 1988).

To determine whether the similarity between K1Gpa2p and *S. cerevisiae* Gpa2p is just a coincidence or whether it is related to the fact that both proteins have similar roles, we investigated the effect of disruption of the chromosomal copy of *K1GPA2*. Chromosomal *K1GPA2* was transplacced by a DNA fragment containing *GPA2* cloned into the integrating vector YIp352 which carries the selectable *URA3* marker. The linearized plasmid, obtained by digesting with *Bgl*II (a naturally occurring site present in the *K1GPA2* open reading frame at positions 348, 408 and 478), was then used to transfect a diploid strain (*Mata1a, Ade2/ade2, ArgAlargA, his3/his3, ura1/ura1*) generated by crossing strain 136 with 155, selecting for

Ura⁺ transformants. The heterozygous *GPA2/gpa2::URA3* diploid was sporulated and ten tetrads were dissected to separate the haploid meiotic spores. Each tetrad gave four viable spores, indicating that *GPA2* is a non-essential gene. Southern analysis of several *uraA* and *UraA* segregants confirmed that the disrupted *gpa2* allele always co-segregated with the *Ura*⁺ phenotype in a 2:2 proportion. Genomic DNA restriction fragments carrying the gene for K1Gpa2p were identified in both wild-type (WM37) and disruptant (Δ GPA2) clones by hybridizing with the radiolabeled PCR product (P-1) according to the conditions described in Materials and Methods. Figure 6 shows an example of the gene structure found in the disruptant clones, compared with that of the wild-type strain. Digestion of chromosomal DNA from Δ GPA2 with *Asp*718 and *Hind*III give rise to two hybridizing fragments due to the presence of one site for each enzyme in the integrating plasmid YIp352, while in the wild-type strain only one fragment can be visualized (the larger band

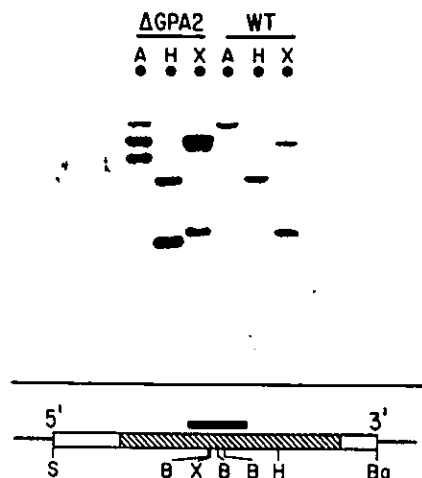


Figure 6. Southern analysis of chromosomal DNA from disruptant and wild-type strains digested with several restriction enzymes and schematic representation of the 1.9 kb fragment carrying the *GPA2* open reading frame. The blot was probed with the 32 P-labeled P-1 PCR fragment. Solid box indicates the probe; hatched box indicates the open reading frame. A, *Asp718*; B, *Bgl*II; Ba, *Bam*HI; H, *Hind*III; X, *Xba*I.

observed in the *Asp718* digestion of Δ GPA2 chromosomal DNA corresponds to a partially digested fragment). The region capable of hybridizing with the probe was split by *Xba*I into two fragments in both the disruptant and the wild-type strain due to the presence of one site for this enzyme within the region of the open reading frame that is recognized by the probe (Figure 6). Southern analysis of the wild-type chromosomal DNA with several other restriction enzymes indicated that this is a single-copy gene in *K. lactis*.

The disrupted haploid segregants were unaltered in their mating capacity, and wild-type cells overexpressing KIGpa2p mate normally, indicating that Gpa2p does not participate in the pheromone response pathway of *K. lactis*. In addition, mutant cells grew at the same rate as wild-type cells; however, the number of cells in saturated cultures of the disrupted strain was twice that of wild-type cultures. This may indicate that the function(s) that are interfered with by Δ Klga2p relate to deregulation of monitoring nutritional conditions, suggesting similarities with the effect of *GPA2* disruption in *S. pombe* (Isshiki *et al.*, 1992).

The alternative system in which yeast G α subunits have been implicated is the regulation of adenylyl cyclase activity, either directly or acting in concert with the *RAS2* product (Isshiki *et al.*, 1992; Nakafuku *et al.*, 1988; Papanavvas *et al.*, 1992). To

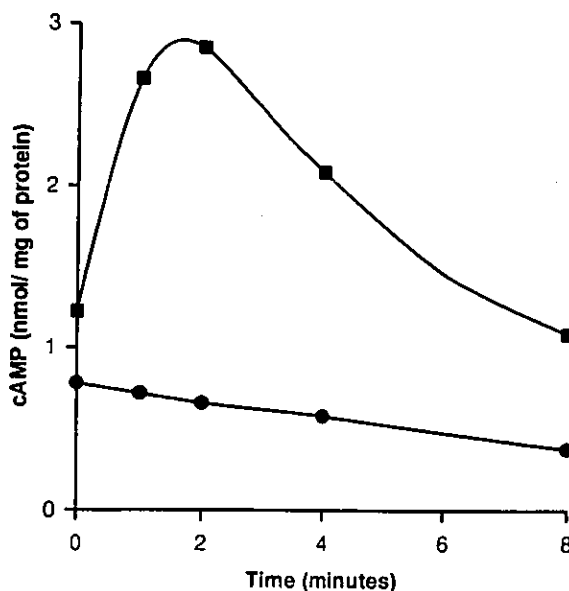


Figure 7. Time course of cAMP production by wild-type (squares) and *gpa2* disrupted (circles) strains. Cells were prepared as indicated in Materials and Methods. The reaction was started at time zero by the addition of 100 mM-glucose. Aliquots were withdrawn at the times indicated and cAMP was determined.

examine the possibility that KIGpa2p may also be involved in the regulation of cAMP levels, we studied the effect of this protein on cAMP formation. Figure 7 is a representative experiment of the kinetics of cAMP formation in response to glucose, measured in glucose-unrepressed cells from both wild-type (WM37) and disrupted (Δ GPA2) strains, following the protocol described in Materials and Methods. Unlike *S. cerevisiae*, where disruption of *GPA2* has no effect on cAMP production, inactivation of KIGpa2p significantly lowered the levels of cAMP. Moreover, the disrupted strain did not show the transient stimulation that addition of glucose produced in wild-type cells. These results indicate that the KIGpa2 subunit is involved in regulation of cAMP levels, presumably by regulating the adenylyl cyclase activity of *K. lactis* and that this regulation should not follow the same rules as those of *S. cerevisiae* cells.

S. cerevisiae cells overexpressing Gpa2p have markedly elevated levels of cAMP and can suppress a temperature-sensitive mutation of *RAS2* (Nakafuku *et al.*, 1988). Mating pheromone inhibits Ras-linked adenylyl cyclase activation and this is dependent upon the α -factor receptor

(Ste2p) and the G-protein β -subunit (Ste4p) (Arkinstall *et al.*, 1992). Indeed, it seems that regulation of adenylyl cyclase in *S. cerevisiae* involves a crosstalk between Ras2p and Gpa2p, although, in physiological conditions the contribution of the $G\alpha$ subunit is rather uncertain. In contrast, no evidence has been obtained to implicate Ras protein(s) in the regulation of adenylyl cyclase in fission yeast where Gpa2p seems to play the major role (Fukui *et al.*, 1986; Isshiki *et al.*, 1992).

Here we showed that in *K. lactis* a heterotrimeric $G\alpha$ subunit (Gpa2p) is involved in the regulation of cAMP production. Others have recently shown the possible participation of Ras-like protein(s) in *in vitro* regulation of adenylyl cyclase (Verzotti *et al.*, 1994). Now the investigation of the *K. lactis* cAMP pathway is becoming an important field to assign specific roles to Ras and Gpa2 proteins in the regulation of adenylyl cyclase activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Soledad Guevara for her technical assistance. We wish to thank Dr H. Fukuhara for providing the MD2/1 strain and KEp6 plasmid. This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 1387-M9206.

REFERENCES

- Arkinstall, S. J., Pappasavvas, S. G. and Payton, M. A. (1991). Yeast α -mating factor receptor-linked G-protein signal transduction suppresses Ras-dependent activity. *FEBS Lett.* **284**, 123–128.
- Birnbaumer, L. (1990). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 675–705.
- Birnbaumer, L. (1992). Receptor to effector signalling through G proteins: Roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* **71**, 1069–1072.
- Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Hewlett, E. L. and Gilman, A. G. (1983). Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet-activating protein. *J. Biol. Chem.* **258**, 2072–2075.
- Codina, J., Hildebrandt, J. D., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R. D. and Mancini, C. R. (1983). Pertussis toxin substrate, the putative Ni of adenylyl cyclases, is an α /beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4276–4280.
- Dietzel, C. and Kurjan, J. (1987). The yeast *SCG1* gene: A $G\alpha$ -like protein implicated in the α - and α -factor response pathway. *Cell* **50**, 1001–1010.
- Elbe, R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* **13**, 18–20.
- Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T. and Yamamoto, M. (1986). Role of *ras* homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* **44**, 329–649.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. and Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163–167.
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T. and Yamamoto, M. (1992). Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a $G\alpha$ subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes & Dev.* **6**, 2455–2462.
- Ito, H., Fukuda, T., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168.
- Johnson, D. R., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J. and Gordon, J. I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 869–914.
- Johnson, G. L., Kaslow, H. R. and Bourne, H. R. (1978). Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **253**, 7120–7123.
- Jones, T. L. Z., Simonds, W. F., Merendino, J. J., Brann, M. R. and Spiegel, A. M. (1990). Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein α subunit is essential for its membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 568–572.
- Kurjan, J. (1990). G proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Iyengar, R. and Birnbaumer, L. (Eds), *G Proteins*, Academic Press, New York.
- Miranda, M., Ramirez, J., Guevara, S., Ongay-Larios, L., Peña, A. and Coria, R. (1995). Nucleotide sequence and chromosomal localization of the gene encoding the old yellow enzyme from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **11**, 459–465.
- Mumby, S. M., Heukeroth, R. O., Gordon, J. E. and Gilman, A. G. (1990). G-protein α -subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 728–732.
- Nakafuku, M., Itoh, H., Nakamura, S. and Kaziro, Y. (1987). Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2140–2144.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., *et al.* (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (*GPA2*) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: Studies on its structure and possible functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1374–1378.
- Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. and Kaziro, Y. (1991). Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein α subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: Involvement in mating and sporulation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5877–5881.

- Papasavvas, S., Arkinstall, S., Reid, J. and Payton, M. (1992). Yeast α -mating factor receptor and G-protein-linked adenylyl cyclase inhibition requires RAS2 and GPA2 activities. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **184**, 1378-1385.
- Pupillo, M., Kagan, A., Pitt, G. S., Firtel, R. A. and Devreotes, P. N. (1989). Multiple α subunits of guanine nucleotide-binding proteins in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4892-4896.
- Sadhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M. J., Reed, S. I. and Hicks, J. B. (1992). A G-protein α subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the α 1- α 2 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1977-1985.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. B. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks, J. B. (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. and Gautam, N. (1992). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.
- Stone, D. E., Cole, G. M., de Barros-Lopes, M., Goebel, M. and Reed, S. I. (1991). N-myristoylation is required for function of the pheromone-responsive G_{α} protein of yeast: conditional activation of the pheromone response by a temperature-sensitive N-myristoyl transferase. *Genes Dev.* **5**, 1969-1981.
- Tang, W. J. and Gilman, A. G. (1992). Adenylyl cyclases. *Cell* **70**, 869-872.
- Tolkacheva, T., McNamara, P., Piekarz, E. and Courchesne, W. (1994). Cloning of a *Cryptococcus neoformans* gene, *GPAL*, encoding a G-protein α -subunit homolog. *Infect. Immun.* **62**, 2849-2856.
- Verzotti, E., Geymonat, M., Valetti, F., Lanzetti, L. and Giunta, C. (1994). In the budding yeast *Kluyveromyces marxianus* adenylyl cyclase is regulated by Ras protein(s) *in vitro*. *Yeast* **10**, 993-1001.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., *et al.* (1989). The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**, 467-477.

VII. Anexo B. Metodologías

Ensayo del doble híbrido

El sistema de interacción que se utilizó está compuesto por los plásmidos pEG202, que contiene el dominio de unión a DNA, pJG4-5, que contiene el dominio de activación, y pSH18-34, en el que se localiza el gen reportero *LacZ*. Los marcos abiertos de lectura de todos los genes fueron obtenidos por PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados con sitios de restricción específicos. El marco abierto de lectura de *GPA1* fue clonado en el pEG202 como un fragmento EcoRI-XhoI (posiciones -2 y 1428); *STE4* fue clonado en el pJG4-5 como un fragmento EcoRI-XhoI (posiciones -5 y 1284). Los marcos de *KIGPA1* y *KIGPA2* fueron clonados como fragmentos NcoI-BstEII (posiciones -2 y 1437) y EcoRI-EcoRI (posiciones -6 y 1134), respectivamente, en el pEG202, mientras que el fragmento Sall-Sall que contenía el marco abierto de *KISTE4* se clonó en el pJG4-5. El gen de la endoquitinasa de *S. cerevisiae* (*Cts1-2*) obtenido por PCR se clonó en marco en el pEG202 para utilizarlo como un control negativo de interacción. La cepa EGY48 de *S. cerevisiae* fue transfectada con las construcciones correspondientes a cada ensayo, y se creció en placas de SGal a 30°C por 12 hrs, después de lo cual se hicieron las determinaciones de actividad de β -galactosidasa

Ensayo cualitativo de β -galactosidasa

Las cepas a ensayar se crecieron en placas de medio mínimo a pH 7 que contenían el cromóforo X-Gal, sustrato de la β -galactosidasa. Se incubaron a 30°C por 48 horas y se observó el desarrollo de coloración azul.

Ensayo cuantitativo de β -galactosidasa

Se creció la cepa en medio mínimo líquido durante toda la noche. Se centrifugó el cultivo 3 minutos a 5 rpm, se lavó dos veces con agua y se determinó el número de células por mililitro. Se preparó un cultivo con 50×10^6 células en 1 ml de medio mínimo de inducción (SGal) se incubó por 15 horas a 30°C. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante; se resuspendieron las células en 250 μ l del amortiguador de β -gal (Tris 1M pH 8, DTT 100mM y glicerol) con PMSF (inhibidor de proteasas). Se agregaron perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) y se agitó en el vórtex a intervalos de 30 segundos, alternando con 30 segundos en hielo durante 5 minutos totales (se continúa con intervalos iguales si después de este tiempo aún no se observa al microscopio el 90% de células rotas). Se adicionó amortiguador de β -gal, se mezcló y se centrifugó 15 min a 14 000 rpm, recuperándose el sobrenadante. Se incubaron 100 μ l de sobrenadante por 5 minutos a 30°C y pasado este tiempo se agregó ONPG. Se incubó a 30°C hasta obtener coloración amarilla y se leyó en un espectrofotómetro a 420 y 550 nm.

VIII. Bibliografía

- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. y Heitman J. (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein α subunit GPA1 and cAMP. *Genes and Development* **11**, 3206-3217.
- Banuet, F. (1998) Signalling in the yeast: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Micr. and Mol. Biol. Reviews* **62**, 249-274.
- Birnbaumer, L. y Iyengar R. (1990) en G proteins. 1ª Edición. Academic Press, Inc. USA.
- Bölker, M. (1998) Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **25**, 143-156.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. y McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: A conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Chen, B., Gao, S., Choi, G.H. y Nuss, D.L. (1996) Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated cAMP levels by a virulence attenuating hypovirus. *PNAS* **93**, 7996-8000.
- Conklin, B.R. y Bourne, H.R. (1993) Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors and effectors. *Cell* **73**, 631-641.
- Denker, B.M., Neer, E.J. y Schmidt, C.J. (1992) Mutagenesis of the amino terminus of the α subunit of the G protein G_o : in vitro characterization of $\alpha_o\beta\gamma$ interactions. *JBC* **267**, 6272-6277.
- DeVivo, M. y Iyengar, R. (1994) G protein pathways: signal processing by effectors. *Mol. Cell. Endocrin.* **100**, 65-70.
- Dietzel, C y Kurjan, J. (1987) The yeast *SCG1* gene: a $G\alpha$ -like protein implicated in the a- and α -factor response pathway. *Cell* **50**, 1001-1010.
- Dohlman, H.G., Song, J., Apanovitch, D.M., DiBello, P.R. y Gillen, K.M. (1998) Regulation of G protein signalling in yeast. *Cell and Dev. Biol.* **9**, 135-141.
- Dolan, J.W. y Fields, S. (1991) Cell-type-specific transcription in yeast. *Bioch. Bioph. Acta* **1088**, 155-169.
- Ferguson, B., Horecka, J., Printen, J., Schultz, J. Stevenson, B. y Sprague, G. (1994) The yeast pheromone response pathway: new insights into signal transmission. *Cell Mol. Biol.* **40**, 223-228.
- Fields, S. y Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* (London) **340**, 245-246.
- Gao, S. y Nuss, D.L. (1996) Distinct roles for two G protein α subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *PNAS* **93**, 14122-14127.

- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.
- Gustin, M., Albertyn, J., Alexander, M. y Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1264-1300.
- Goffeau, A. et al (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-567.
- Heideman, W. y Bourne, H.R. (1990) Structure and function of G-protein α chains. En G proteins. 1ª Edición. Academic Press, Inc. USA
- Hepler, J.R. y Gilman, A.G. (1992) G proteins. *TIBS* **17**, 383-387.
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **52**, 536-556.
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T. Y Yamamoto, M. (1992) Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G α subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes & Development* **6**, 2455-2462.
- Jones, T.L., Simonds, W.F., Meredino Jr., J.J., Brann, M.R. y Spiegel, A.M. (1990) Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein α subunit is essential for its membrane attachment. *PNAS USA* **87**, 568-572.
- Knall, C. y Johnson, G.L. (1998) G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J. Cell. Biochem.* **30/31**, 137-146.
- Kübler, E., Mösch, H.U., Rupp, S. y Lisanti, M.P. (1997) Gpa2p, a G-protein α -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *JBC* **272**, 20321-20323.
- Kurjan, J. (1992) Pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1097-1129.
- Kurjan, J. (1993) The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 147-179.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. y Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**, 621-628.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N., Hamm, H.E. y Sigler, P.B. (1996) The 2.0Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-319.
- Landry, S., Pettit, M.T., Apolinario, E. y Hoffman, C.S. The fission yeast *git5* gene encodes a G β subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* **154**, 1463-1471.

- Leberer, E., Dignard, D., H Marcus, D., Thomas Y. y Whiteway, M. (1992) The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J* **11**, 4815-4824.
- Leberer, E., Dignard, D., H Marcus, D., Hougan, L., Whiteway, M. y Thomas Y. (1993) Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* STE5 as a suppressor of a Ste20p protein kinase mutant: structural and functional similarity of Ste5 to Far 1. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 241-254.
- Linder, M. E. y Gilman, A.G. (1992) G proteins. *Scientific American*, julio, 36-43.
- Linder, M.E., Middleton, P., Hepler, J.R., Taussig, R. Gilman, A.G. y Mumby, S.M. (1993) Lipid modifications of G proteins: α subunits are palmitoylated. *PNAS USA* **90**, 3675-3679.
- Liu, H., Styles, C.A. y Fink, G. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-1744.
- Lorenz, M.C. y Heitman, J. (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G protein α homolog. *EMBO J* **16**, 7008-7018.
- Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P. y Heitman, J. (2000) The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 609-622.
- Miyajima, I., Nakafuku, M., Nakayama, N., Brenner, C., et al (1987) *GPA1*, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction. *Cell* **50**, 1011-1019.
- Nakafuku, M., Itoh, H., Nakamura, S. y Kaziro, Y. (1987) Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins. *PNAS USA* **84**, 2140-2144.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K. y Kaziro, Y. (1988) Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (*GPA2*) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *PNAS USA* **85**, 1374-1378.
- Neer, E.J. (1994) G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Science* **3**, 3-14.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.
- Noel, J.P., Hamm, H.E. y Sigler, P.B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**, 654-663.
- Nomoto, S., Nakayama, N., Arai, K. y Matsumoto K. (1990) Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *EMBO J* **9**, 691-696.

- Northup, J.K., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *PNAS USA* **77**, 6516-6520.
- Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. y Kaziro, Y. (1991) Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein α subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *PNAS USA* **88**, 5877-5881.
- Ozier-Kalogeropoulos, O., Malpertuy, A., Boyer, J., Tekaiia, F. y Dujon, B. (1998) Random exploration of the *Kluyveromyces lactis* genome and comparison with that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **26**, 5511-5524.
- Papasavvas, S.G., Arkininstall, S., Reid, J. y Payton, M. (1992) Yeast α -mating factor receptor and G-protein-linked adenylyl cyclase inhibition requires Ras 2 and Gpa2 activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1378-1385.
- Rall, T.W., Sutherland, E.W., y Wosilait, W.D. (1956) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *JBC* **218**, 483-495.
- Reed, S.I. (1991) Pheromone signaling pathways in yeast. *Curr. Op. in Genet. and Develop.* **1**, 391-396.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. y Kahmann, R. (1996) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- Rens-Domiano, S. y Hamm, H.E. (1995) Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. *FASEB J* **9**, 1059-1066.
- Robertson, L. y Fink, G. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *PNAS USA* **95**, 13783-13787.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.
- Simonds, W.F. (1994) G protein by subunits: diversity, structure and function. In G proteins. Molecular Biology Intelligence Unit, R.G. Landes Company
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E. y Sigler, P.B. (1996) Cristal structure of a GA protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* **379**, 369-374.
- Spiegel, A.M., Backlund Jr., P.S., Butrynski, J.E., Jones, T.L.Z. y Simonds, W.F. (1991) The G protein connection: molecular basis of membrane association. *TIBS* **16**, 338-341.
- Sprague, Jr. G. (1991) Signal transduction in yeast mating. *TIG* **7**, 393-397.
- Sudbery, P. (1994) The non-*Saccharomyces* yeasts. *Yeast* **10**, 1707-1726.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- Swinkels, B.W., van Ooyen, A.J. y Bonekamp, F.J. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 187-201.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S. et al (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**, 27-36.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G. y Sprang, S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$. *Cell* **83**, 1047-1058.
- Wedegaertner, P.B., Chu, D.H., Wilson, P.T. et al. (1993) Palmitoylation is required for signaling functions and membrane attachment of $Gq\alpha$ and $Gs\alpha$. *JBC* **268**, 25001-25008.
- Wésolowski-Louvel, M. y Fukuhara, H. (1995) A map of *Kluyveromyces lactis* genome. *Yeast* **11**, 211-218.
- Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K.D. y Fukuhara, H. (1996) *Kluyveromyces lactis*; Genetics, Biochemistry and Molecular Biology of Non-conventional Yeast. Ed. Por K. Wolf. Spring Verlag.
- West, R.E. Jr, Moss, J., Vaughan, M. et al. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *JBC* **260**, 14428-14430.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L. et al (1989) The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**, 467-477.
- Whiteway, M., Clark, K.L., Leberer, E., Dignard, D. y Thomas D.Y. (1994) Genetic identification of residues involved in association of α and β G-protein subunits. *Mol. and Cel. Biol.* **14**, 3223-3229.
- Whitmarsh, A.J. y Davis, R.J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS* **23**, 481-485.
- Xue, Y., Battle, M. y Hirsch, J.P. (1998) *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the $Gpa2p$ $G\alpha$ subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* **17**, 1996-2007.
- Yuan, Y.O., Stroke, I.L. y Fields, S. (1993) Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the $\alpha 1$ and *STE12* proteins. *Genes and Development* **7**, 1584-1597.
- Yun, C., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K. y Kumagai, H. (1998) *Gpr1p*, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* **252**, 29-33.