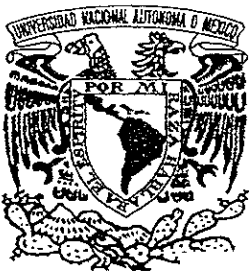


213



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EMPLEO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DETERMINANTES DEL SEXO EN LA LEVADURA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

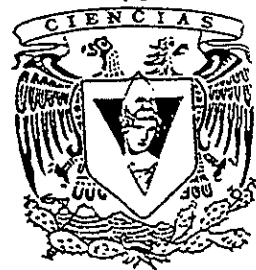
P R E S E N T A:

RODOLFO ZAMUDIO OROZCO

ASESOR: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

MÉXICO, D. F.

2001



FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA ESCOLAR

294305



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"EMPLEO DE LA EXPRESION DIFERENCIAL PARA LA
IDENTIFICACION DE GENES DETERMINANTES DEL
SEXO EN LA LEVADURA"

realizado por Zamudio Orozco Rodolfo

con número de cuenta 8614926-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Roberto Coria Ortega

Propietario Dra. Laura Ongay Larios

Propietario Biol. Vicente Castrejón Tellez

Suplente Biol. Norma Alejandra Figueroa Rios

Suplente Biol. David Garciadiego Cázares

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología
Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a todas aquellas personas que por razones de amistad y cariño han compartido un poquito de su vida conmigo

En primer lugar, se la dedico a mis padres, Áurea y Rodolfo, quienes me vieron nacer y a quienes debo tanto; a mis hermanos, Enrique y Ernesto, que han tenido que soportar el mal humor de su hermano mayor y a quienes les agradezco su compañía de toda una vida; y a mi abuelo Rafael, que desde hace tiempo quería ver terminada esta tesis.

No me olvido por supuesto de todos los amigos y amigas que de repente entran en la vida de uno y ahí se quedan. Por lo tanto, este pequeño escrito esta dedicado también a : Sara Trovato, a Vicente Cortes, a Manuel Cervantes, a la "Chulis", a Rocio Campillo, a Emilio Adam, a Irving Contreras, a Marta Zamora, al "Charlie", a Pepe Blancas, a Fernando Peña, a Ariadna, a Edith, a Octavio, a Aurora, a Quique, a Sergio, a Blas y a muchos amigos mas.

Por ultimo, quiero dedicar esta tesis a las personas honestas que durante 10 meses de huelga compartieron sueños, trabajos, preocupaciones y alegrías.

INDICE

Páginas

| | | |
|---------|--|----|
| I. | INTRODUCCION | |
| I.1. | Generalidades de <i>Kluyveromyces lactis</i> | 1 |
| I.2. | Ciclo de vida de <i>Kluyveromyces lactis</i> | 1 |
| I.3. | Las levaduras como sistema modelo | 2 |
| I.4. | Sistema de respuesta a feromona | 3 |
| I.5. | Regulación génica y diferenciación sexual en levaduras | 4 |
| I.6. | Genes sexo específicos | 6 |
| I.7. | Receptores de feromonas | 6 |
| I.8. | Feromonas de apareamiento | 7 |
| I.9. | Aglutininas | 8 |
| I.10. | Ste6 | 8 |
| I.11. | Inactivadores de feromonas | 9 |
| II. | JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO | 10 |
| III. | METODOLOGIA | |
| III.1. | Cepas y medios | 11 |
| III.2. | Extracción de RNA total | 11 |
| III.3. | Extracción de RNA mensajero | 11 |
| III.4. | Electroforesis de RNA total | 12 |
| III.5. | Purificación de plásmidos | 12 |
| III.6. | Extracción de DNA a partir de geles de agarosa | 12 |
| III.7. | Marcaje de sondas radiactivas | 12 |
| III.8. | Análisis de Southern blot | 13 |
| III.9. | Prehibridación e Hibridación | 13 |
| III.10. | Construcción de minibancos | 13 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSION | |
| IV.1. | Expresión Diferencial | 15 |
| IV.2. | Estudio de expresión génica utilizando como sonda el fragmento 13df | 16 |
| IV.3. | Construcción de un minibanco de DNA cromosomal de K. lactis cortado con EcoRI | 18 |
| IV.4. | Caracterización del fragmento clonado | 21 |
| V. | PERSPECTIVAS | 26 |
| VI. | CONCLUSIONES | 27 |
| VII. | BIBLIOGRAFIA | 28 |
| VIII. | APENDICE | 32 |

I. INTRODUCCION

I.1. Generalidades de *Kluyveromyces lactis*

K. lactis es un hongo de talo unicelular de forma esférica u oval, que pertenece a la clase Ascomycetes y, es por tanto, un productor de ascosporas (Wesolowski- Louvel, M et al., 1996). Al igual que todas las células eucariotes posee un núcleo, en cuyo interior se encuentran alojados 6 cromosomas de tamaño relativamente grande, como demuestran los perfiles cariotípicos obtenidos en estudios electroforéticos, utilizando la técnica de electroforesis en gel de campo ortogonal (Sor and Fukuhara,1989). Algunas cepas presentan el fenotipo "Killer" conferido por un par de plásmidos lineales citoplásmicos que codifican y regulan la producción de una proteína tóxica. La pared celular de estos organismos esta constituida principalmente por polisacáridos del tipo de las mananas, beta glucanas y quitina (Herrera y Ulloa,1990).

Habita en ambientes naturales muy variados, aunque una buena parte de las cepas de este organismo han sido aisladas a partir de productos lácteos sobre los que crece muy bien, aprovechando la lactosa como fuente de carbono. Además de la lactosa, *K. lactis* crece bien sobre una gran variedad de fuentes de carbono. Presenta un metabolismo aeróbico y al igual que la mayoría de las especies de levaduras, *K. lactis* es un organismo fermentativo facultativo. A diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, organismo en el que la presencia de glucosa reprime fuertemente muchas vías metabólicas, como la utilización de galactosa, en *K. lactis* la represión por glucosa es mucho menos pronunciada (Wesolowski- Louvel, M. et al., 1996).

I.2. Ciclo de Vida de *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis tiene un ciclo de vida muy parecido al de *Saccharomyces cerevisiae*. Este es haplodiplobióntico, es decir, consta de una fase haploide y una diploide. Presenta 2 tipos celulares haploides, llamados **a** y **alfa**, que están especializados en el apareamiento y que pueden proliferar vegetativamente por gemación. Esta forma de reproducción vegetativa continúa siempre y cuando en el medio existan suficientes recursos nutritivos. Cuando los recursos alimenticios se agotan, las células dejan de proliferar y se mantienen en la fase G₁ del ciclo celular, hasta que las condiciones vuelven a ser favorables. Un proceso semejante de interrupción del ciclo ocurre cuando 2 células haploides de tipo sexual opuesto se encuentran una muy cerca de la otra. En este caso, las células **a** y **alfa** se comunican utilizando feromonas, las cuales disparan una serie de respuestas fisiológicas en las células receptoras, encaminadas a prepararlas para el apareamiento. Entre estas respuestas esta la interrupción del ciclo celular en la fase G₁ y la formación de gametos. La fusión de 2 gametos de tipo opuesto genera el tercer tipo especializado de células, el diploide **a/alfa**. Este diploide puede dividirse mitóticamente por gemación; en el caso de *K. lactis*, a diferencia de lo que ocurre con *S. cerevisiae*, esta fase es breve, y una vez que ésta concluye, el diploide se divide meióticamente formando 4 ascosporas incluidas en un asca. Las ascosporas germinan y 2 de ellas dan origen a células haploides de tipo **a**, mientras que las otras 2 originan células **alfa**, con lo que reinicia de nuevo el ciclo (Wesolowski- Louvel, M. et al., 1996).

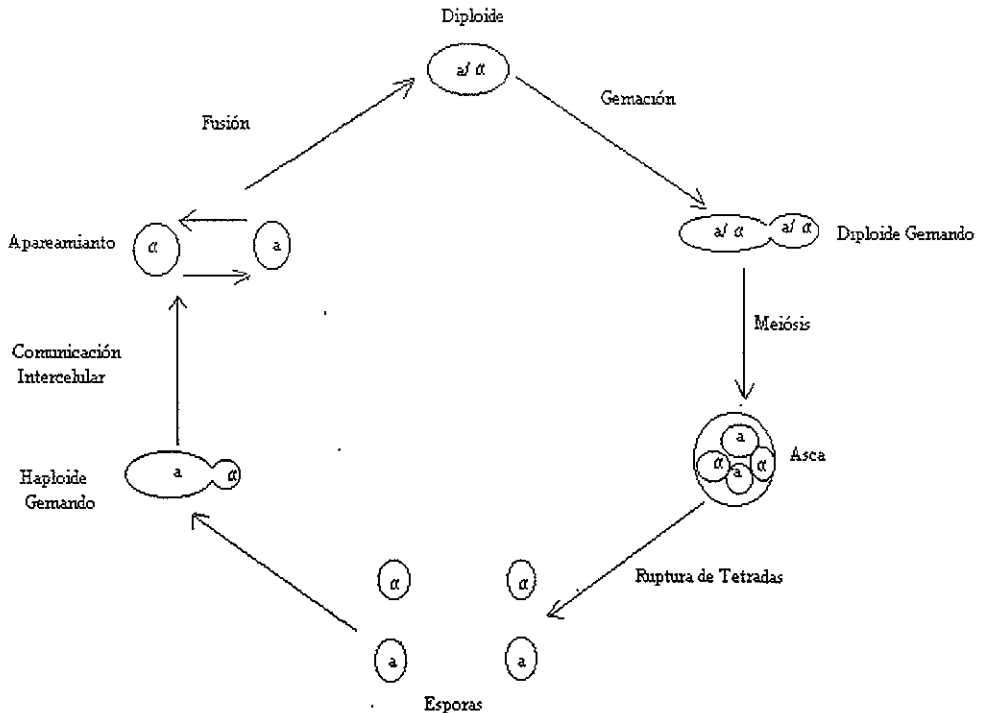


Figura 1 Ciclo de Vida de *K.lactis*

El ciclo de vida de *K.lactis* es complejo y comprende una fase haploide y una diploide de duración breve. Ambas fases son capaces de reproducirse asexualmente, produciendo pequeñas gemas a partir de la célula madre. Solamente la fase haploide es capaz de reproducirse sexualmente. Este fenómeno se presenta cuando los tipos haploides *a* y *alfa* se encuentran muy cerca uno del otro, lo que permite el intercambio de feromonas. Estos mensajeros químicos provocan la diferenciación terminal de los haploides los cuales se convierten en gametos. Los gametos se fusionan entre si, generando la fase diploide. El diploide es la fase del ciclo de vida que puede esporular y producir nuevamente células haploides

1.3. Las Levaduras como Sistemas Modelo

Algunas especies de levadura, en particular *S. cerevisiae*, son utilizadas como sistemas modelo en el estudio de numerosos procesos biológicos fundamentales como. la iniciación de la replicación del DNA y de la transcripción, el control del ciclo celular, el envejecimiento, la diferenciación celular, la regulación génica y en el estudio de los sistemas de transducción de señales, entre otros (Jeansonne,1994). El gran atractivo que las levaduras ofrecen como sistemas modelo radica en su condición de microorganismos eucariontes. Al igual que las bacterias, las levaduras se mantienen fácilmente en el laboratorio y crecen a tasas elevadas; además de que en ellas pueden aplicarse con facilidad métodos bioquímicos y genéticos para el estudio a nivel celular y molecular de la biología del organismo. Por otra parte, al ser eucariontes, los conocimientos y metodologías generados durante el estudio de las levaduras pueden ser aplicables, aunque no en su totalidad ni en todos sus detalles, al estudio de organismos eucariontes superiores, incluido el hombre (Botstein and Fink,1998).

K. lactis es un magnífico hospedero para la expresión de genes heterólogos y es utilizado en la producción a nivel industrial de algunos productos como la lactasa. Este hecho ha incrementado el interés de algunos laboratorios en el estudio de este organismo (Swinkels, 1993)

I.4. Sistema de Respuesta a Feromonas

El sistema de transducción de señales mediado por feromonas ha sido estudiado de forma intensiva en *S. cerevisiae*, por lo que algunos aspectos de este mecanismo son bien conocidos. En contraparte, en *K. lactis*, muy poco se conoce sobre este mecanismo, por lo que la mayoría de los datos que a continuación se presentan corresponden al sistema de transducción de señales de *S. cerevisiae*. Las células haploides *a* y *alfa* se comunican entre sí utilizando pequeños péptidos de secreción llamados feromonas. Estas feromonas son de 2 tipos distintos: el factor *a*, producido por las células *a* y el factor *alfa*, que es sintetizado por las células *alfa*. A su vez cada tipo celular exhibe en su superficie un receptor específico para la feromona del sexo opuesto (Ferguson et al. 1994). La unión del receptor con su ligando específico genera una señal interna que compromete a la célula haploide a entrar en un proceso de diferenciación celular, que prepara a la célula para el apareamiento y que involucra cambios morfológicos y fisiológicos como: la interrupción del ciclo celular en la fase G₁, la inducción transcripcional de genes cuyos productos participan en el apareamiento y la formación de gametos (Konopka and Fields, 1992).

Los componentes del sistema de transducción de señales corriente abajo con respecto al receptor son idénticos en las 2 clases de células sexuales. El proceso comienza con la unión de la feromona con su receptor específico; éste es una proteína de 7 segmentos transmembranales, que está asociada mediante su extremo carboxilo a una proteína G heterotrimérica. La proteína G está constituida por las subunidades α , β y γ . En la forma inactiva de la proteína, las 3 subunidades se asocian y forman un complejo heterotrimérico, en el que la subunidad α se halla unida a una molécula del dímero β - γ . Al ser activada la proteína G, la subunidad α se separa del dímero β - γ . Una vez liberado el heterodímero es capaz de propagar la señal activando probablemente a la molécula Ste5p (Whiteway et al. 1995). La molécula Ste5p es un homodímero que contiene sitios de unión para las proteínas Ste11p, Ste7p y Fus3. La interacción entre el dímero β - γ y Ste5p promueve un cambio conformacional en esta última molécula. La modificación en la estructura de Ste5p provoca la activación de Ste11p, la cual fosforila a Ste7p. Esta última molécula, a su vez, fosforila y activa a Fus3. (Elion, 1995). El orden en el que actúan las cinasas se determinó con estudios de dobles mutantes (Herskowitz, 1994). A partir de Fus3p el sistema se ramifica; en una de las ramas es estimulada la proteína Ste12p, un factor de la transcripción que activa genes sexo y haploide específicos relacionados con el apareamiento. En la segunda rama se activa Far1 que detiene el ciclo celular en la fase G₁,

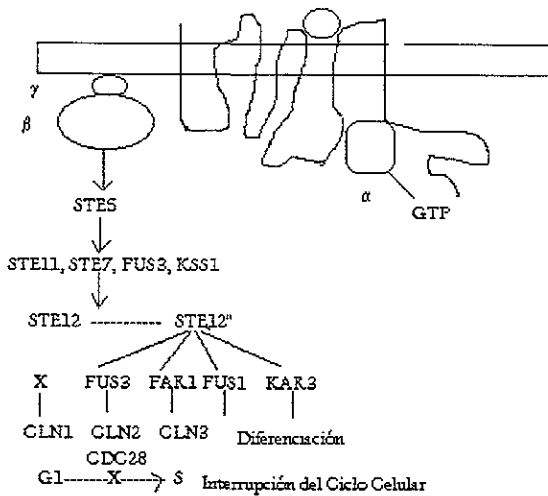


Figura 2. Sistema de Transducción de Señales Activado por Feromonas en *Saccharomyces cerevisiae*.

La reproducción sexual en *S. cerevisiae* se desencadena por la interacción entre las feromonas, secretadas por las células haploides *a* y *alfa*, y sus receptores específicos, ubicados en la superficie celular de las levaduras. Esta interacción activa a una proteína G heterotrimérica, que a su vez prende una cascada de señalización interna, en la que participan diversas protein cinasas como Ste11p, Ste7p, Fus3p y Far1p, que actúan de manera consecutiva. Tanto Fus3p como Far1p son proteínas, que al ser activadas interrumpen el ciclo celular en la fase G1. El sistema de transducción de señales también activa a la proteína Ste12p que participa en la regulación transcripcional de una variedad de genes involucrados en la formación de gametos y en el apareamiento entre ellos.

1.5. Regulación Génica y Diferenciación Sexual en Levaduras

En la construcción de los organismos multicelulares participan muchos tipos de células distintas. Las neuronas por ejemplo se distinguen perfectamente en estructura y función de los hepatocitos o de cualquiera de las muchas clases de células que existen en el cuerpo de un vertebrado, aunque los genomas de estas células sean idénticos entre sí. En estos organismos es muy evidente el fenómeno de diferenciación celular. Aunque no sea evidente, la diferenciación celular en levaduras es un fenómeno real. En *K. lactis* y *S. cerevisiae* existen 2 tipos de células sexuales haploides, una llamada *a* y otra *alfa*, que al conjugarse generan un tercer tipo celular diploide capaz de esporular. Las células *a* y *alfa* sintetizan un número pequeño de proteínas únicas que son responsables de las propiedades de cada tipo celular (Sprague, 1983). Estas moléculas que determinan la identidad de las células sexuales son proteínas sexo específicas, es decir, moléculas que se producen en uno de los tipos celulares, pero no en el otro y viceversa. Al igual que en los organismos multicelulares la diferenciación celular en levaduras implica el fenómeno de regulación génica. La identidad de cada uno de los tipos celulares está determinada por la acción del locus MAT, el cual controla la expresión diferencial de 4 conjuntos génicos, que son los siguientes:

Genes alfa específicos: Estos genes se expresan únicamente en los haploides de tipo *alfa*

Genes *a* específicos: Se expresan solamente en las células tipo *a*.

INTRODUCCION

Genes haploide específicos. Estos genes están activos en las células haploides de ambos tipos

Genes diploide específicos: Como su nombre lo indica funcionan solamente en los diploides *alalfa*. (Cross,1988):

En *S. cerevisiae* existen 2 alelos diferentes del locus MAT, el alelo MATa y el MATalfa, cada uno de los cuales se encuentra en uno solo de los tipos celulares. Estos alelos codifican proteínas reguladoras (Grayhac,1992). El alelo MATalfa, presente solamente en las células alfa, codifica 2 proteínas reguladoras: la proteína alfa1 es necesaria para la transcripción de los genes *alfa* específicos y la proteína alfa 2, un represor de la transcripción que inhibe a los genes *a* específicos. La presencia de estos 2 factores de transcripción va a determinar que en las células *alfa* solo estén activos los genes *alfa* específicos, ya que los *a* específicos estarán inactivos por la acción de la proteína alfa 2. Las células a contienen el alelo MATa, que también codifica 2 proteínas: la llamada proteína a 1, que no tiene ninguna función en las células haploides *a*, pero que si participa como correpresor, junto con la proteína alfa 2, de los genes haploide específicos en las células diploides *alalfa*. La proteína a 2 también esta codificada por el alelo MATa, pero su función es desconocida. La regulación de los genes *a* específicos esta controlada por la proteína represora alfa 2; cuando esta proteína no se encuentra presente, como sucede en las células *a*, entonces los genes *a* específicos pueden expresarse. Estos reguladores de la transcripción de genes sexo específicos no actúan solos, sino que forman parte de una red de regulación en la que también intervienen las proteínas MCM1 y STE12 (Smith and Johnson,1992). Las proteínas MCM1 y STE12 están presentes en los 2 tipos de células haploides (Hagen,1993).

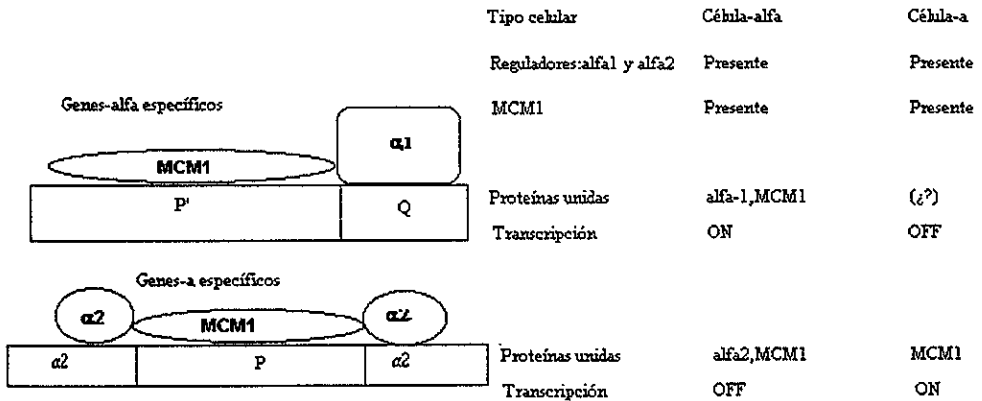


Figura3. Regulación de los Genes Sexo Específicos por los Productos del Locus MAT.

A nivel genético las células *a* y *alfa* se diferencian solamente por el tipo de alelo que poseen en el locus MAT. Las células *a* contienen el alelo MATa y las células *alfa* el alelo MATalfa. Ambos alelos codifican proteínas que participan en la regulación transcripcional de genes específicos. En el caso del alelo de MAT *alfa*, este codifica para 2 proteínas, la proteína alfa 1 y la alfa 2. La primera de ellas es un regulador positivo que tiene que estar presente para que los genes *alfa* específicos puedan expresarse. La acción de estas 2 proteínas garantiza que en las células *alfa* solo se expresen los genes *alfa* específicos. El alelo MATa codifica también 2 proteínas: *a* 1 y *a* 2. De la segunda se desconoce su función. La proteína *a* 1 es un regulador negativo que actúa de manera conjunta con alfa 2 en los diploides y de esta manera inactiva una serie de genes haploide y sexo específicos. En las células de tipo *a* los genes *a* específicos pueden expresarse porque no existe el regulador negativo alfa 2 y los genes *alfa* específicos se hallan apagados por la ausencia de alfa 1.

1.6. Genes sexo específicos

Por definición los genes sexo específicos se expresan solamente en las células *a* o en las *alfa* y su transcripción esta controlada por los productos del locus *MAT*.

En la siguiente tabla se muestran algunas características de estos genes:

Tabla 1. Genes Sexo Especificos

| Genes | Función | Cromosoma en el que se ubica el locus | Longitud de la proteína | Localización de la proteína | Tipo celular | Inducible por feromona |
|----------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|------------------------|
| AGA2 | Aglutinador sexo específico | 7 | 69 | Pared celular | a | Si |
| STE2 | Receptor de feromona-alfa | 6 | 430 | Membrana plasmática | a | Si |
| STE3 | Receptor de factor-a | 11 | 469 | Membrana plasmática | alfa | Si |
| AGAalfa1 | Proteína de aglutinación | 10 | 650 | Pared celular | alfa | Si |
| BAR1 | Proteasa de factor -alfa | 9 | 563 | Espacio periplásmico | a | Si |
| STE6 | Translocador de factor -a | 11 | 1290 | Membrana plasmática | a | Si |
| MFA1 | Feromona a | 4 | 12 | Extracelular | a | Si |
| MFA2 | Feromona-a | 14 | 12 | Extracelular | a | Si |
| Mfalfa2 | Feromona-alfa | 7 | 13 | Extracelular | alfa | Si |
| Mfalfa1 | Feromona-alfa | 16 | 13 | Extracelular | alfa | Si |
| SSL1 | Inactivador de factor- a | 12 | ¿? | ¿? | alfa | Si |

1.7. Receptores de Feromonas

Las células poseen receptores de superficie que les permiten recibir estímulos del medio exterior, en forma de señales químicas. Estas señales conducen a una serie de cambios en el estado funcional de las células o bien a su diferenciación (Jeansonne, 1994).

Cada uno de los tipos haploides de *Saccharomyces cerevisiae* exhibe en su superficie celular un receptor específico que se une al oligopéptido secretado por el sexo opuesto. Esta unión desencadena una serie de eventos de diferenciación que preparan a las células para el apareamiento (Cross, 1988). Los receptores de feromonas de *S. cerevisiae* son productos sexo específicos. Ste3p es el receptor producido por

INTRODUCCION

las células *alfa*, mientras que Ste2p es el receptor sintetizado por las células *a*. La comparación de las secuencias de estos 2 receptores no arroja ninguna homología entre ellos, ni con ninguna otra proteína cuya secuencia sea conocida (Bender and Sprague, 1986). Sin embargo, entre ambas existen semejanzas a nivel de la organización estructural. Este tipo de organización estructural es característico de una familia de receptores entre los que se encuentran incluidos el receptor \square -adrenérgico, la rodopsina y el receptor de acetilcolina. Todos estos receptores poseen 7 regiones transmembranales y están asociados a proteínas G.

STE2

El gen STE2 es inducido cuando las células *a* están expuestas a factor alfa. Codifica un receptor integral de membrana, con una longitud de 431 aa y un peso molecular de 49,000 daltones. Presenta 6 sitios potenciales de unión a cadenas de carbohidratos. Posee 7 regiones transmembranales y está asociado a una proteína G heterotrimérica. (Blumer, 1988).

STE3

Este es un gen *alfa* específico que codifica una proteína de 470 aa que, al igual que los otros miembros de la familia de receptores de 7 segmentos transmembranales, está asociada a una proteína G heterotrimérica. Presenta 5 regiones potenciales de unión a cadenas de carbohidratos y se encuentra ubicada en la membrana celular. Su función es la de unir factor *a* y disparar señales intracelulares (Jones et al, 1992).

1.8. Feromonas de Apareamiento

Las feromonas de *S. cerevisiae* son pequeños péptidos utilizados por las células *a* y *alfa* para comunicarse entre sí. Estos oligopéptidos son moléculas sexo específicas: las células *a* producen factor *a* y las células *alfa* generan factor *alfa* (Jones et al, 1992). Ambas feromonas son esenciales para el apareamiento, aunque no lo son para la viabilidad de las células. Además de disparar la diferenciación celular en sus respectivas células blanco, las feromonas son indispensables para que los gametos emitan sus proyecciones celulares en la dirección correcta, y de esta forma puedan encontrarse con la proyección del gameto de sexo opuesto y fusionarse. Las células que no producen feromona son estériles, aunque se les suministre esta de manera exógena (Caplan and Kurjan, 1991).

Feromona-a

La feromona *a* está codificada por 2 genes estructurales distintos, el MFA1 y el MFA2. Ambos genes son funcionales en las células de tipo *a* y contribuyen de igual forma a la producción de factor *a* (Michaelis and Herskowitz, 1998). La traducción de los RNA's mensajeros de MFA1 y MFA2 genera precursoras que son modificados postraduccionalmente antes de convertirse en feromona *a* madura. Estas modificaciones postraduccionales incluyen el procesamiento proteolítico de los precursores, así como la adición de grupos farnesilo y metilo a una cisteína del extremo carboxilo de la feromona *a*. Estas modificaciones son indispensables para el correcto funcionamiento de las feromonas.

Feromona alfa

Esta es una molécula de 13 aminoácidos de longitud, que es producida solo por las células *alfa*. El factor *alfa* maduro es producido a partir de precursores más largos, los cuales son codificados por 2 genes estructurales, los llamados Mfalfa1 y Mfalfa2. La diferencia entre estos 2 genes es que Mfalfa1 codifica para un precursor que lleva en su extremo amino terminal 4 factores alfa maduros separados por pequeñas secuencias

INTRODUCCION

de aminoácidos, mientras que el precursor de Mfalfa2 solo lleva 2 factores alfa maduros. Estas feromonas alfa quedan liberadas de sus precursores gracias a una serie de reacciones proteolíticas catalizadas por las enzimas Kex2p, Kex1p y Ste13p (Caplan and Kurjan,1991). El gen Mfalfa1 tiene una contribución mayor en la producción de feromona *alfa* que el gen Mfalfa2.

I.9. Aglutininas

Como preludio al apareamiento, las células haploides *a* y *alfa* de *S. cerevisiae*, después de haber sido estimuladas por las feromonas del sexo opuesto, sintetizan unas glicoproteínas de pared celular llamadas aglutininas (Cappellaro,1994). Estas aglutininas sexo específicas aumentan la eficiencia de conjugación, pero no son esenciales para el proceso.

Aglutinina *a*

Las aglutininas del tipo *a* son producidas por las células haploides *a* y consisten de 2 subunidades: una subunidad de anclaje a la pared celular y otra que contiene el sitio de unión que reconoce a la aglutinina *alfa* del sexo opuesto. El gen AGA1 codifica la unidad de anclaje, que es una proteína de 73Kda rica en residuos de treonina y serina y que establece enlaces disulfuro con la subunidad de unión, con lo que ésta queda unida a la pared. La subunidad de unión, producto del gen AGA2, es una proteína pequeña de 7.48Kda y 69 residuos de aminoácidos altamente glicosilada. (Capellaro et al,1991).

Aglutininas *alfa*

Las células haploides *alfa* al ser estimuladas por la feromona-*a* producen aglutinina *alfa* la cual está formada por un único polipéptido. La aglutinina *alfa* es una glicoproteína de 631 aminoácidos, unida a 12 cadenas de carbohidratos y que alcanza un peso molecular de 200Kda. Esta molécula está anclada a la pared celular. (Capellario et al,1994).

Las aglutininas *a* y *alfa* se localizan en las paredes de sus tipos de apareamiento respectivos e interaccionan entre sí formando complejos 1:1 (Capellaro et al,1991).

I.10. STE6.

El mecanismo clásico de secreción en eucariontes involucra el paso de estas por el sistema retículo endoplásmico-aparato de Golgi-vesículas de secreción. En las células haploides de tipo *a* fue descubierto un sistema de transporte de proteínas de naturaleza distinta al clásico; este sistema alternativo funciona aún cuando el transporte de proteínas entre los distintos compartimientos está bloqueado por mutaciones en los genes SEC (Kuchler et al,1989).

En este sistema de secreción de proteínas novedoso en los eucariontes, juega un papel crucial el producto del gen STE 6, que se expresa solamente en las células *a*. La Ste6p es una proteína cuya secuencia de aminoácidos tiene una homología muy estrecha con las P-glicoproteínas de los mamíferos, involucradas en la resistencia de células tumorales a una gran variedad de fármacos (McGrath,1989). Al igual que las P-glicoproteínas, Ste6p es una proteína integral de membrana que consta de 2 regiones, cada una de las cuales está formada por 6 dominios transmembranales y una región hidrofílica de unión a ATP; Ste6p es una proteína de 1280 aa de longitud y que tiene un 57% de homología con MDR1, una proteína integral de membrana humana que mide 1290 aa. El gen STE6 no es esencial para la viabilidad de la célula pero si es indispensable

INTRODUCCION

para que las células-*a* puedan aparearse. Cuando una célula tipo *a* carece de gen STE6 no puede secretar feromona aunque si la produce, y por lo tanto no puede aparearse con una célula de sexo opuesto. El gen es inducido cuando las células *a* son expuestas a factor *alfa* (Kuchler,1989)

I.11. Inactivadores de feromonas

La exposición a feromonas del sexo opuesto promueve en las células haploides de *S. cerevisiae* una serie de cambios , entre los cuales destaca la interrupción del ciclo celular en la fase G₁. Las células que no consiguen aparearse se recuperan, es decir, adquieren nuevamente la capacidad de dividirse por gemación. La recuperación es un fenómeno en el que intervienen varios mecanismos, algunos de los cuales son haploide específicos-la endocitosis de receptores de feromonas, el incremento en la tasa de hidrólisis de GTP en la subunidad alfa de las proteínas G, mediada por la proteína SST2-mientras que otros son sexo específicos como por ejemplo, los mediados por las proteínas BAR1 y SSL1.

SSL1

Las células *alfa* de *S. cerevisiae* presentan mecanismos que les permiten recuperarse después de la exposición a feromonas. Uno de tales mecanismos es una actividad presente solamente en este tipo de células y que está gobernada por el producto del gen SSL1 (Steden and Duntze,1990), cuya presencia inactiva al factor *a*; es por tanto, una actividad análoga a la de la proteína BAR1 en las células *a*. Al parecer la proteína SSL1 no es secretada al medio extracelular, sino que permanece anclada a la superficie celular. Esta proteína no es indispensable para la viabilidad ni para el apareamiento (Steden et al,1989).

BAR1

Las células de tipo de apareamiento-*a* en *S. cerevisiae* que han sido estimuladas por feromona *alfa* y que no han logrado conjugarse entran en un periodo de recuperación que consiste en la finalización del arresto celular , y por lo tanto, del reinicio del ciclo vegetativo (Manney,1983).

Varios son los mecanismos que contribuyen a este proceso. Uno de estos mecanismos fue definido como "la capacidad de las células MAT para impedir la difusión de factor *alfa* en una placa de agar suave (Manney,1983), y que recibió el nombre de factor barrera. Una proteína codificada por el gen BAR1 es el responsable de este efecto barrera. La proteína Bar1p es una molécula sexo específica , sintetizada únicamente por las células haploides de tipo *a* (Wolfgang and Schmitt,1997). Esta molécula es secretada al espacio periplásmico, en donde se encarga de degradar al factor *alfa*, rompiéndolo entre los aminoácidos 6 y 7 de la molécula; es por tanto una endopeptidasa. Bar1 es una proteína de 587 aa, que tiene homología con los miembros de la familia de las aspartilproteasas, y que se parece mucho a la pepsina (Mackay et al,1988) Es una molécula termoestable unida a varias cadenas de carbohidratos. El gen BAR1 es inducido por la presencia de feromona *alfa* (Manney,1983).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El estudio de la diferenciación celular pasa necesariamente por la identificación y caracterización de aquellos genes que se expresan diferencialmente. Una técnica desarrollada recientemente para alcanzar este fin es el despliegue diferencial, que permite el análisis comparativo de la expresión genética entre 2 o más células distintas con un fondo genético idéntico. El método descansa en 2 procesos: El primero de ellos es la síntesis de cDNA, utilizando un primer que va dirigido contra una fracción de RNAs mensajeros de aproximadamente 1/12 del total de mensajeros de una célula. Dicho primer está constituido por una secuencia de oligo d(t) y dos nucleótidos adicionales. Son estos 2 nucleótidos los que dan al primer la capacidad para seleccionar a la subpoblación de mensajeros que servirá como molde para la transcriptasa inversa. El segundo proceso es un PCR que amplifica las moléculas de cDNA producidas en el paso anterior. La reacción de PCR se realiza con 2 primers: uno de ellos es el primer utilizado en la reacción anterior y el otro es un decámero de secuencia aleatoria. Este segundo primer se asocia de manera específica con su secuencia complementaria contenida en algunas especies de RNAs mensajeros. Solamente estos RNAs mensajeros serán amplificados. Por otra parte, estas secuencias que son complementarias al decámero de secuencia aleatoria no se encuentran situadas al mismo nivel en las distintas clases de RNAs mensajero, lo que determina que los productos amplificados a partir de diferentes especies de mensajeros tengan tamaños distintos. Estas diferencias en tamaño pueden revelarse en una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los cDNAs amplificados de los 2 tipos celulares en estudio se someten a electroforesis en un gel de tipo secuenciación y se identifican las bandas que solo se presentan en una de las células, pero no en la otra, y viceversa. El cDNA de las bandas elegidas puede recuperarse y ser utilizado para clonar los genes involucrados en los procesos de diferenciación celular. Por lo tanto, esta técnica se constituye como una valiosa herramienta para la clonación de genes que se expresan diferencialmente entre 2 células distintas, situación que se presenta en los 2 tipos haploides de *K. lactis*.

El sistema de transducción de señales activado por feromonas y que promueve el apareamiento entre las células haploides de *S. cerevisiae* está formado en parte por proteínas sexo específicas, como STE2, STE3, Bar1, SSL1, MFA1 y 2 y, Malfa 1 y 2. Por lo tanto, para estudiar y comprender el sistema de respuesta a feromonas es necesario identificar los genes sexo específicos implicados en este proceso. Por otra parte, las proteínas sexo específicas son también importantes porque son moléculas especie específicas, que determinan que las células haploides α y a de *K. lactis* puedan aparearse entre sí, pero que no lo puedan hacer con células haploides de otras especies de levaduras. Este proyecto nace por el interés del laboratorio en el estudio de los componentes y mecanismos del sistema de respuesta a feromonas en *K. lactis*.

El objetivo de este trabajo es clonar un gen sexo específico de la levadura *Kluyveromyces lactis*, a partir de un banco de genes del mismo organismo. La búsqueda de este gen se hará utilizando una sonda de 162 bases obtenida mediante un despliegue diferencial hecho en las cepas WM27 y WM37 de *K. lactis*.

III. METODOLOGIA

III.1. Cepas y medios

Las cepas de *K. lactis* utilizadas en este estudio fueron la WM27 (alfa, Lis⁻) y la WM37 (a, His⁻). Estas cepas se crecieron sobre medio YPD (ver apéndice). Se utilizaron bacterias de la cepa DH5 α para los ensayos de transformación. Estas bacterias se crecieron en medio LB (ver apéndice).

III.2. Extracción de RNA total

Las cepas WM27 y WM37 fueron crecidas en medio líquido YPD, a 30°C en agitación continua durante una noche. Al día siguiente, la densidad de los cultivos se midió en un espectrofotómetro. Cuando ésta alcanzó un valor de 0.5 de absorbancia, las células se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 400 μ l de buffer AE (50 mM de acetato de sodio pH 5.3, 10 mM EDTA). Las células se rompieron agregando 40 μ l de SDS 10%. Se adicionó un volumen de fenol y se incubaron los tubos de reacción a 65°C durante 4 minutos. Posteriormente fueron transferidos a un baño de alcohol con hielo seco y se mantuvieron ahí hasta que el fenol cristalizó. Se hizo una centrifugación a 14,000 rpm durante 2 minutos. De esta centrifugación resultaron 2 fases. Se recuperó la fase acuosa que contenía el RNA. Para purificar esta molécula se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm durante 5 minutos. Nuevamente se recuperó la fase acuosa. Para precipitar el RNA se agregaron a la fase acuosa 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M a pH 5 y se mantuvo la mezcla a -20°C por 20 minutos. Después se hizo una centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos, se lavó el pellet con etanol al 80% e inmediatamente se retiró el alcohol. El pellet libre de etanol se resuspendió en agua destilada. La concentración de RNA recuperada se midió en un espectrofotómetro a 260 nm.

III.3. Extracción de RNA mensajero

El aislamiento de RNA m de las cepas WM27 y WM37 se hizo utilizando un kit de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente: Se utilizó como material de partida 1 mg de RNA total de cada una de las cepas y se diluyó en agua destilada. Esta dilución se colocó en un baño a 65°C por 10 minutos. Después del baño se adicionó inmediatamente una solución con oligo d(T) biotinilado. Esta molécula puede unirse por complementariedad de bases con la cola de poli (A) de los RNAs mensajeros, pero no puede unirse a las otras clases de RNA. La mezcla se incubó a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregó la solución de RNAs a una suspensión que contenía unas bolitas magnéticas conjugadas a estreptavidina. La estreptavidina es una sustancia que tiene mucha afinidad a la biotina. Por lo tanto, los RNAs mensajeros hibridados con los oligo d (T) biotinilados quedaron asociados a las bolitas magnéticas con estreptavidina. Se realizaron 3 lavados suaves para eliminar los RNAs no asociados a las bolitas magnéticas. Finalmente el RNA mensajero asociado a las partículas magnéticas, se disoció de éstas agregando agua destilada y resuspendiendo de manera muy cuidadosa las bolitas. Se utilizó un imán para atraer a las partículas magnéticas y se recuperó el agua destilada, en la que se encontraba el RNA m.

III.4. Electroforesis de RNA total

Para determinar la integridad de los RNA totales obtenidos se hicieron electroforesis en geles de agarosa con formaldehído, siguiendo el protocolo de Maniatis. Los geles se prepararon con agarosa al 1%, formaldehído al 37%, buffer de corrida 5x. Las muestras de RNA se mezclaron con agua destilada, buffer de corrida 5x, formaldehído al 37% y formamida. Estas muestras se calentaron a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente se agregó buffer de carga y bromuro de etidio (1 mg/ml) para detectar el RNA en el gel. El gel se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

III.5. Purificación de plásmidos

Las bacterias transformadas con los plásmidos se sembraron en medio líquido LB con ampicilina (60 µg / ml) y se incubaron a 37°C durante una noche. Al día siguiente, las células se centrifugaron a 5 000 rpm por 10 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 5 ml de NaCl 10 mM. Se repitió la centrifugación. Las células fueron lisadas en buffer TENS (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 0.5 % SDS, 0.1 N NaOH). Se agregaron 0.6 ml de acetato de sodio 3 M a pH5 y se hizo una incubación en hielo por 15 minutos. La mezcla se centrifugo a 7000 rpm durante 15 minutos y se conservó el sobrenadante, que contenía el DNA. Para separar los ácidos nucleicos de las proteínas presentes en el sobrenadante se hicieron 2 extracciones con un volumen de fenol-cloroformo (1:1), centrifugando la mezcla 5 minutos a 5000 rpm. Se recuperó la fase acuosa. Los plásmidos se precipitaron en presencia de etanol frío al 100% e incubando esta mezcla a temperatura ambiente. Después de la incubación se hizo una centrifugación a 8500 rpm por 10 minutos. Se lavó el pellet con etanol al 70%. El pellet libre de alcohol fue resuspendido en agua destilada. Para degradar al RNA que pudiera estar presente se incubó la solución con 5 µl de RNasa A (10 mg / ml) 30 minutos a 37°C.

III.6. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

Se localizó en el gel de agarosa la banda de DNA de interés y se cortó con una navaja. El fragmento de agarosa obtenido se colocó en un ependorff lleno con fibra de vidrio. Se hicieron 2 centrifugaciones a 7000 rpm durante 30 segundos cada una. Durante las centrifugaciones la agarosa quedó atrapada en la fibra de vidrio, mientras que la solución que contenía el DNA pasaba a través de ella. El sobrenadante recuperado se mezcló con 3 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5. De esta manera se precipitó el DNA. Posteriormente se hizo una centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se hizo un lavado rápido con etanol al 70%. El pellet obtenido se resuspendió en agua destilada.

III.7. Marcaje Radiactivo de sondas

El DNA se marcó utilizando el procedimiento de Random Primer's de GIBCO- BRL , siguiendo las especificaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente: El DNA se puso a hervir durante 10 minutos; de esta manera se desnaturalizó la molécula. Después de la desnaturalización, el DNA se colocó en hielo y se le agregaron las siguientes soluciones: 2 µl de dATP, 2 µl de dGTP, 2 µl de dTTP, 15 µl de Random Primers Buffer Mixture y 5 µl de ($\alpha^{32}P$) dCTP. Se mezcló todo y se agregó 1 µl de fragmento Klenow, incubándose la

mezcla una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se agregaron 5 µl de buffer de terminación de reacción. El DNA marcado se separó de los nucleótidos no incorporados mediante columnas de Shepadex G-50. Sobre la columna se colocó la sonda marcada y se hizo una centrifugación a 1600 rpm durante 4 minutos. De esta manera se obtuvo la sonda purificada lista para usarse.

III.8. Análisis de Southern Blot

Para hacer este análisis se siguieron los principios establecidos por Southern (Maniatis, 1987). El DNA cromosomal de *K. lactis* se cortó con las siguientes enzimas de restricción: *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* o *HindIII*. El DNA cortado con las enzimas de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1 % a 50 volts. Cuando concluyó la electroforesis, el gel completo se incubó en una solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), en agitación continua durante 45 minutos. Esto con la finalidad de desnaturalizar las moléculas de DNA presentes en el gel. Después de los 45 minutos, se transfirió el gel a una solución de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1 M, pH 7) donde se mantuvo en agitación durante 45 minutos. Posteriormente el gel se puso en contacto con una membrana de nylon. Las moléculas de DNA se transfirieron por capilaridad del gel a la membrana de nylon. El DNA transferido se fijó permanente a la membrana mediante un tratamiento con luz ultravioleta.

III.9. Prehibridación e Hibridación

La prehibridación tiene como objetivo bloquear con DNA de salmón los sitios de una membrana de nylon no ocupados por los ácidos nucleicos que estamos estudiando y que fueron previamente fijados a ella. Las membranas de nylon fueron tratadas durante 4 horas con una solución de prehibridación (SSC 6x, Denhardt's 5x, SDS 0.5% y 1 mg/ 10 ml de DNA de esperma de salmón) a 60°C. Concluida la prehibridación se virtió la sonda radiactiva sobre la solución de prehibridación en la que se hallaba la membrana de nylon. La hibridación se hizo a 60°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces con una solución (SSC 2x, SDS 0.5%) a 65°C durante 15 minutos cada lavado. La detección de las señales positivas se hizo con un "phosphorimager".

III.10. Construcción de minibancos

Los minibancos se construyeron con DNA cromosomal de *K. lactis* cortado con la enzima *EcoRI*. El DNA cromosomal del tamaño deseado, extraído de geles de agarosa, se ligó con el plásmido bluescript, cortado a su vez con *EcoRI*. Para la transformación se utilizaron bacterias competentes de la cepa DH5α. La competencia es la capacidad, adquirida mediante un tratamiento, que tienen las bacterias para incorporar moléculas de DNA presentes en su medio externo. El procedimiento fue el siguiente: Se mezclaron las células competentes y el plásmido con el inserto, y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las bacterias se sometieron a un cambio drástico de temperatura: Se incubaron a 42°C por 3 minutos. Posteriormente se agregó 1 ml de medio LB y se hizo una incubación a 37°C por una hora. Se centrifugaron las

METODOLOGIA

células y una parte del medio fue descartada. Se agregaron 50 μ l de β -gal y 10 μ l de IPTG y la pastilla de células fue resuspendida suavemente. Las células se plaquearon en cajas LB ampicilina y se incubaron una noche a 37°C. Al día siguiente se revisaron las colonias. Algunas eran azules y otras blancas. Se seleccionaron estas últimas. Las colonias seleccionadas se hicieron crecer en cajas con LB ampicilina y fueron utilizadas para hacer un screening con la sonda 13, en la búsqueda de genes sexo específicos. Los ácidos nucleicos de las colonias seleccionadas fueron transferidas a membranas de nylon de la siguiente forma. El papel nylon se colocó sobre las colonias dejándose sobre ellas 2 minutos. Transcurrido este tiempo, la membrana de nylon se puso en contacto, de manera consecutiva, con 3 pedazos de papel 3 MM. El primero de ellos estaba impregnado con una solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), el otro con solución de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1 M) y el tercero con buffer de lavado (2 x SSC). Cada una de estos pasos duró 5 minutos. Finalmente el DNA se entrecruzó con luz ultravioleta.

IV. Resultados y Discusión.

IV.1. Expresión Diferencial.

El despliegue diferencial es una metodología que permite comparar la expresión genética entre 2 tipos celulares distintos. En el laboratorio se hizo un despliegue diferencial para tratar de identificar los genes sexo específicos de las cepas WM27 y WM37 de *K. lactis* (trabajo realizado por la Dra. Laura Ongay).

La técnica consiste en hacer una retrotranscripción de los RNAs mensajeros de ambas cepas, utilizando la enzima retrotranscriptasa reversa y un primer de DNA dirigido contra la cola de poli (A) de los RNAs mensajeros. Los productos de cDNA resultantes de esta reacción fueron amplificados por PCR, utilizando primers de secuencia aleatoria de 10 nucleótidos de longitud y el primer anterior. Los productos de cDNA obtenidos fueron separados en un gel de secuenciación. Ya que los cDNAs de ambas cepas habían sido corridos en paralelo se pudo hacer una comparación entre las bandas de DNA de uno y otro tipo celular. De esta comparación resultó que 6 bandas de cDNA presentes en la cepa WM27 no se encontraban en la WM37, y que en esta última se encontraron 7 bandas ausentes en la cepa WM27.

El cDNA de estas 13 bandas resultó interesante, porque el hecho de que estuvieran presentes, estos fragmentos, en un tipo celular pero no en el otro, sugería fuertemente que estos productos génicos estaban codificados por genes expresados diferencialmente. Se extrajo el cDNA de estas 13 distintas bandas, se reamplificó por PCR y cada una de ellas fue clonada en un plásmido. Los 13 fragmentos fueron secuenciados en geles de poli(acrilamida). Para explorar si alguno de estos fragmentos de cDNA pudiera ser el producto de genes de expresión diferencial se realizó una hibridación de tipo dot-blot, utilizando los RNAs mensajeros de la cepa WM27 y WM37. Las sondas marcadas radiactivamente, utilizadas en este estudio, fueron sintetizadas a partir de cada uno de los 13 segmentos seleccionados. Los ensayos tipo blot mostraron que algunas de las sondas marcadas radiactivamente hibridaban de manera preferencial con los RNAs de una de las cepas, pero no con los de la otra, lo que indicaba que los transcritos reconocidos por estas sondas se estaban produciendo de manera diferencial en las cepas α y β . Uno de estos fragmentos, que se expresaba en la cepa WM27 pero no en la WM37, recibió el nombre de 13df y fue seleccionado para ser utilizado como sonda en la búsqueda de su gen de origen. Otro dato importante que hay que mencionar es que el fragmento 13df fue obtenido en el despliegue diferencial a partir de la cepa WM27. El fragmento 13df tiene una longitud de 162 pares de bases (ver figura 5) y en él puede apreciarse la cola de poli (A) que es característica de los extremos 3' de los RNAs mensajeros eucariotes.

```

1      agccagcgaa aatgtaaga agcataacaa gaagaacaag aagcgtaga
51     aaaaggctc catgtttcc gattaatgta agfactatct aaattcatcc
101    taaactcta tatatatata aatccactgt ttgcacagtc tattatcccc
151    aaaaaaaaaa aa

```

Figura 5 . La secuencia de 162 bases que aparece arriba es uno de los 13 fragmentos de cDNA resultantes de un despliegue diferencial, hecho para identificar genes expresados diferencialmente en las cepas WM27 y WM37 de *Kluyveromyces lactis*. Esta secuencia recibió el nombre de fragmento 13df y fue utilizada como sonda en la búsqueda de un gen putativamente sexo específico. En el fragmento puede apreciarse la cola de poli (A), que es una estructura recurrente en los RNAs mensajeros de eucariotes y que se encuentra en el extremo 3' de estas moléculas.

IV.2. Estudio de Expresión Génica utilizando la sonda 13df

El gen que especifica el fragmento 13df recibió el nombre Kldf13. Para determinar si este gen se expresa de manera diferencial en las cepas WM27 y WM37 se hizo una hibridación de tipo dot-blot, en la que se utilizó como sonda radiactiva el fragmento 13df. Para este estudio de expresión génica era importante poner concentraciones aproximadamente iguales de los RNAs de las 2 cepas en estudio. Para igualar estas concentraciones se realizó primero una hibridación de tipo dot-blot, utilizando como sonda el gen de actina de *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó este gen heterólogo, porque su secuencia se halla muy bien conservada y porque además se expresa de manera constitutiva y de forma muy abundante en todas las células eucariontes. Al tratarse de un gen que se expresa de manera semejante en las células *a* y *alfa* de *K. lactis*, sus transcritos pueden ser utilizados para igualar concentraciones de RNA de 2 muestras distintas. El gen de actina de *Saccharomyces cerevisiae* hibrida fácilmente con el gen de actina de *K. lactis*. RNAs mensajeros y totales de las cepas WM27 y WM37 se pusieron a hibridar con el gen de actina de *Saccharomyces cerevisiae* (ver figura 6a).

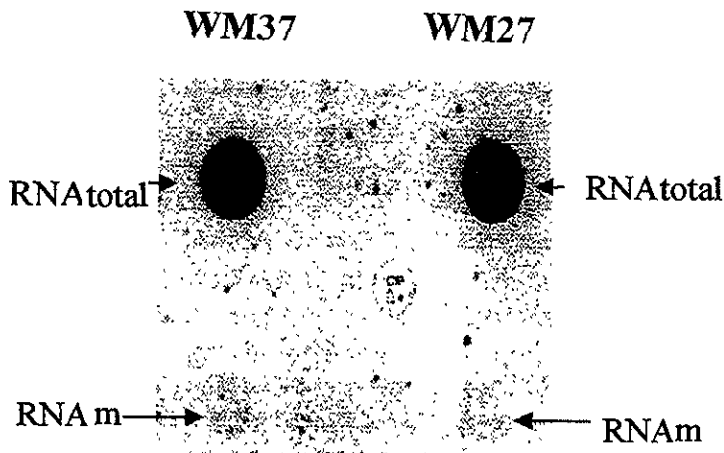


Figura 6a. Dot-blot entre el gen de actina de *S.cerevisiae* y los RNA totales y mensajeros de cepas de WM27 y WM37 de *K.lactis*. En el ensayo se utilizaron aproximadamente 27.7 μ g de RNA total de ambas cepas y 232 ng de RNAs mensajeros. En el caso de los RNA totales mostrados en la imagen, la densidad de ambas cepas es aproximadamente la misma, mientras que en los RNAs mensajeros la concentración de los mensajeros de la cepa WM27 resultó ser aproximadamente 25% menor que la concentración de mensajeros en la cepa WM37.

Las señales resultantes fueron analizadas por densitometría: las cantidades de RNA total de las 2 cepas eran prácticamente iguales. En el caso de los mensajeros la señal de la cepa WM27 resultó ser menor que la de la cepa WM37, por lo que tuvo que hacerse un cálculo para igualar ambas cantidades, y así poder realizar el estudio de expresión con la sonda 13df. Habiéndose conseguido aproximar las concentraciones de RNAs de ambas cepas, se fijaron RNAs totales y mensajeros de la cepa WM27 y de la WM37 en una membrana de nylon. Se utilizaron 2 distintas cantidades de RNA total 27.7 μ g y 55.4 μ g y 2 diferentes cantidades de RNAs mensajeros 232 ng y 464 ng, de cada una de las cepas. Esta membrana de nylon se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hibridó con la sonda radiactiva 13df. La imagen resultante de esta hibridación tipo Dot-Blot se presenta en la figura 6b. En ella no aparecieron señales ni del RNA total de la cepa WM27 (55.4 µg; posición 2B) ni del RNA total de la cepa WM37 (27.7 µg; posición 1D), esto se debe, quizás a que estas muestras no se transfirieron a la membrana durante el proceso de fijación. En el caso de los mensajeros las señales de las moléculas de RNA procedentes de la cepa WM27 resultaron ser mayores que las de los mensajeros de la cepa WM37 (ver tabla 2). Los datos que se muestran en la tabla son porcentajes de los valores de densitometría obtenidos para los RNAs mensajeros de la figura 6b. Se consideró como 100% el valor de densitometría mas alto, y a partir de este se calcularon los demas. Como puede verse los valores para la cepa WM27 fueron mayores que los de la WM37. Estos datos, apoyados con aquellos obtenidos anteriormente en el laboratorio, apuntan en la dirección de que el gen *Kidf13* se trata de un gen que se expresa mas en la cepa WM27 que en la WM37, y por lo tanto, quizás el gen se trata de un gen sexo específico de las células de *Kluyveromyces lactis*. Teniendo estos resultados en mente se procedió a clonar el gen con la sonda 13df.

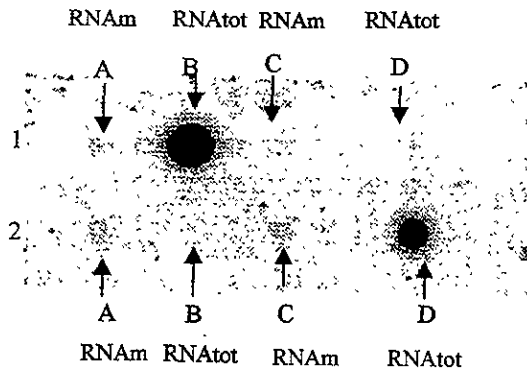


Figura 6b. Hibridación de tipo Dot-blot entre el fragmento 13df y los RNAs totales y mensajeros de la cepa WM27 y WM37. Las muestras de la cepa WM37 se colocaron en la línea 1 y las de la WM27 en la línea 2. Se utilizaron 2 cantidades de RNA total y 2 de RNA mensajero. Estas cantidades se fijaron en la membrana de nylon tal y como se describe a continuación: Posiciones 1A y 2A:464 ng de RNAm; posiciones 1B y 2B:54.74 µg; Posición: 1C y 2C:232 ng de RNAm; 1D y 4D:27.37 microgramos de RNA total. No aparecieron señales en los RNA totales de las posiciones 2B y 1D. En el caso de los mensajeros se observan señales en todas las posiciones, aunque resultan mas intensas en las de la cepa WM27.

Tabla 2. Señales de los RNAs mensajero de las cepas WM27 y WM 37 hibridadas contra el fragmento 13df. Las señales se expresaron en porcentajes de densitometría.

| Cepas | Porcentaje de la señal |
|---------------|------------------------|
| WM27 (232 ng) | 97.47% |
| WM37 (232 ng) | 78.73% |
| WM27 (464 ng) | 100 % |
| WM37 (464 ng) | 80.75 % |

IV.3. Construcción de un minibanco de DNA cromosomal de *K. lactis* cortado con EcoRI

En un principio se intentó clonar el gen Kldf13 (es decir el gen que codificaba para el fragmento 13df) a partir de un banco de genes de *K. lactis* construido en el plásmido KEp6 y contenido en *E. coli*. La búsqueda del gen, en este banco, se hizo utilizando como sonda radiactiva el fragmento 13 df. Se hicieron varios ensayos, sin embargo, ninguno de ellos tuvo éxito. Probablemente esto se debió a que el gen buscado no se hallaba representado dentro del banco genómico a nuestra disposición. Después de estos intentos fallidos se decidió replantear la estrategia a seguir. El siguiente paso fue construir minibancos para tratar de aislar el gen de interés. Los minibancos se construyen con una pequeña fracción del genoma de los organismos. En este caso se utilizó DNA cromosomal de la cepa de referencia WM37 de *K. lactis*. El DNA cromosomal fue cortado con una de las siguientes enzimas: *BamHI*, *EcoRI*, *HindI* o *PstI*. Después de una hora de digestión las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Una vez concluida la electroforesis, el DNA del gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon, siguiendo el método de Southern. La membraba de nylon con el DNA entrecruzado se puso a hibridar con la sonda radiactiva 13df. La sonda radiactiva hibrido con algunos fragmento de DNA (ver figura 7).

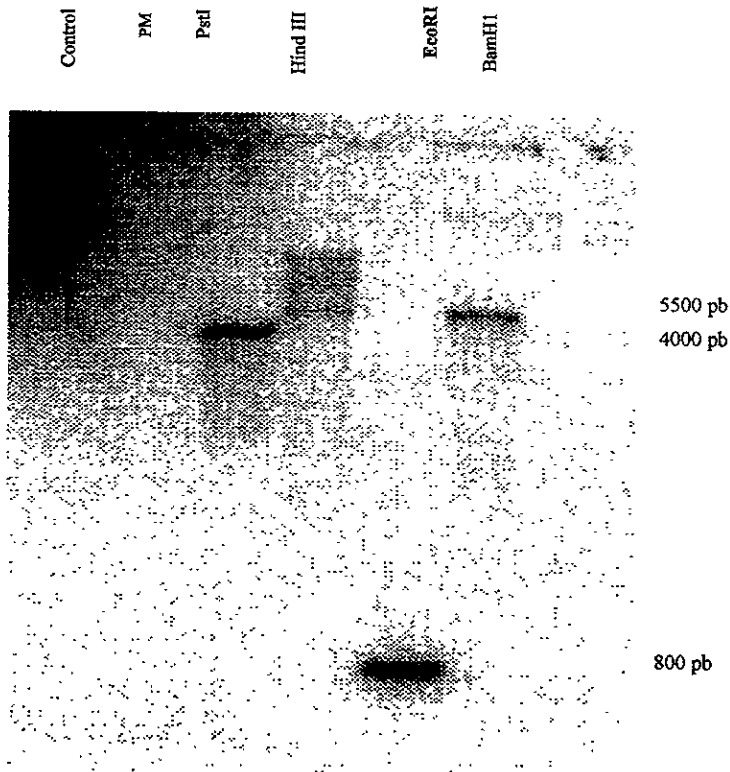


Figura 7. Ensayo de hibridación de tipo Southern. En esta figura se muestra el resultado de una hibridación tipo Southern, en el que se utilizó la sonda radioactiva 13df dirigida contra DNA cromosomal de *K. lactis* cortado con *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* y *BamHI*. En el carril marcado *EcoRI* se observa una señal positiva de aproximadamente 800 pb; en el DNA cortado con *PstI* se observa una señal que alcanza aproximadamente 4000 pb y una última señal en el carril de *BamHI*, en el que se encontró una banda de aproximadamente 5500 pb.

En el DNA cromosomal cortado con la enzima *EcoRI*, la sonda 13df híbrido con una región que tenía un tamaño aproximado de 800 pb. La sonda híbrido también con un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 4000 pb obtenido mediante digestión con la enzima *PstI*. En los cromosomas digeridos con *BamHI* se observó una señal positiva, localizada en una zona de aproximadamente 5500 pb. En el caso de la enzima cortada con la enzima *HindIII* no se apreció una banda positiva bien definida. Lo que puede observarse en su carril (ver figura 7) es un barrido oscuro en la parte superior. Este barrido muy probablemente se debió a que el DNA no fue bien digerido por *HindIII*. Se decidió trabajar con el de DNA cromosomal, de aproximadamente 800 pb, obtenido mediante digestión con la enzima *EcoRI*. El DNA de este tamaño se aisló por extracción de geles de agarosa, tal y como se describe en la metodología. Para asegurar la extracción del fragmento de interés de aproximadamente 800 pb, se localizó en el gel una zona que contenía fragmentos de entre 750 y 900 pb y se cortó toda. Esta región, a su vez, se dividió en varias tiras delgadas de gel y a partir de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cada una de éstas se extrajo el DNA presente en ellas. Para determinar si el gen que buscábamos se encontraba en el DNA extraído del gel, se procedió a hacer una hibridación tipo dot -blot. Alícuotas de las muestras de DNA se fijaron por goteo en una membrana de nylon. La membrana se utilizó en un ensayo de hibridación contra la sonda radiactiva 13df. De este ensayo resultaron algunas señales positivas (No se muestra la figura). El DNA de las muestras que dieron señal positiva en el dot -blot, se utilizó para construir el minibanco de genes. Los fragmentos de DNA se ligaron con el plásmido bluescript cortado con *EcoRI*. Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para transformar bacterias de la cepa DH5 α . Las bacterias transformantes desarrollaron colonias azules o blancas. Se seleccionaron las blancas y se sembraron en forma de parches en medio sólido LB ampicilina. Cada uno de estos 45 parches era una clona bacteriana transformada por un plásmido recombinante. Los plásmidos recombinantes contenidos en estas clonas eran el minibanco. Para determinar si en este minibanco se hallaba el gen Kldf13, se transfirió el DNA de los parches a membranas de nylon, fijándose en ellas. Estas membranas fueron utilizada en un ensayo de hibridación contra el fragmento marcado 13df; algunas colonias exhibían una señal positiva muy débil (no se muestra la figura) Para concluir si las señales positivas de estas colonias eran realmente positivas o no, se tomaron muestras de ellas, se resembraron, su DNA fue transferido a una membrana de nylon y se repitió la hibridación con la sonda 13df. Este nuevo experimento fue concluyente, ya que algunas de las colonias arrojaron una señal positiva muy intensa (ver figura 8).

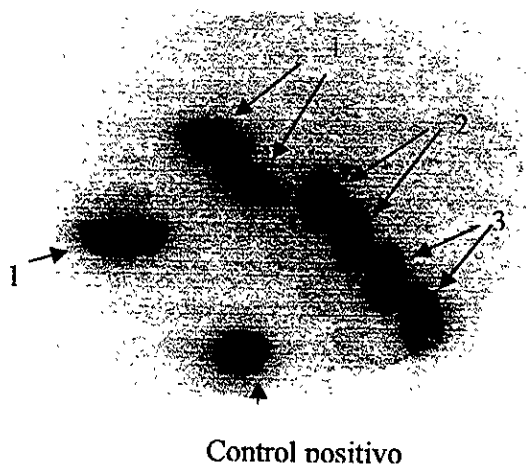


Figura 8. Hibridación de la sonda 13df con un minibanco de DNA cromosomal de *K. lactis* cortado con *EcoRI*, y contenido en el plásmido bluescript. En la imagen se muestran 7 señales positivas y el control. Las señales marcadas con el mismo número representan subclonas de un mismo origen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar si la longitud del fragmento clonado correspondía o no con el resultado que se había obtenido en la hibridación tipo Southern, se extrajeron plásmidos de una de las colonias que dio resultado positivo, se digirieron con la enzima *EcoRI* y se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El tamaño del inserto fue, como se esperaba, de aproximadamente 800 pb (figura 9)

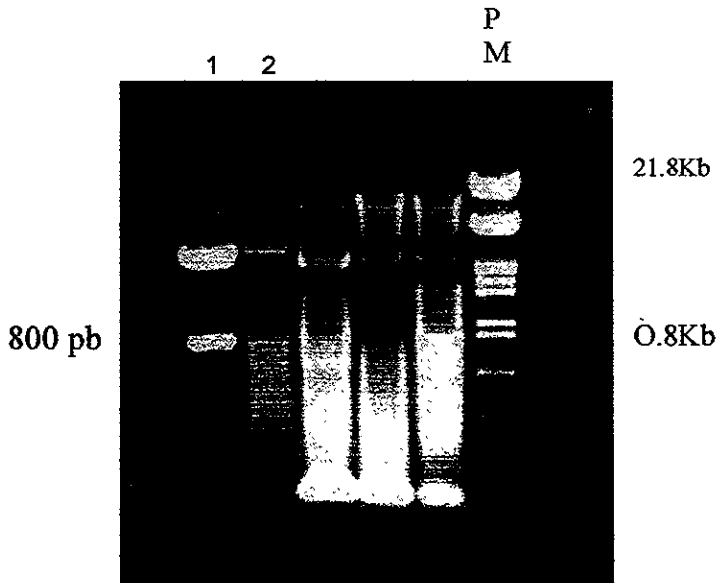


Figura 9.- Electroforesis del fragmento clonado. El plásmido bluescrip con el inserto fue extraído de una de las colonias, fue digerido con *EcoRI* y se sometió a una electroforesis. En los carriles 1 y 2 pueden observarse los productos de la digestión. La banda superior representa el plásmido linearizado y la inferior el inserto de DNA cromosomal de *K. lactis*. Como puede observarse el fragmento tiene aproximadamente 800pb. El plásmido del primer carril fue purificado con un mini-prep, y el del segundo mediante un short melton prep.

IV.4. Caracterización del fragmento Kldf13

El fragmento Kldf13 obtenido a partir del minibanco genómico fue secuenciado en un secuenciador automático. Su tamaño real resultó ser de 850 pares de bases (ver figura 10). En el interior de Kldf13, tal y como se muestra en rojo en la figura 10, se encuentra la secuencia del segmento 13df, utilizado como sonda en este estudio. Era muy importante establecer la localización de la secuencia 13df dentro del fragmento Kldf13, ya que dicha secuencia marca de manera muy precisa el extremo 3' del Marco de Lectura Abierto de Kldf13. Esto debido a que los pequeños segmentos de cDNA, generados en el despliegue diferencial, son secuencias del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

extremo 3' de los RNAs mensajeros. Habiéndose determinado la posición de la secuencia 13df dentro del segmento clonado se procedió a buscar un Marco de Lectura Abierto en éste. El Marco de Lectura Abierto encontrado tiene una longitud de 366 b (ver figura 10). En él no se encontró ningún codón de inicio de la traducción, lo que sugiere que el gen *Kidf13* es mucho más largo, y que por lo tanto, solo se pudo clonar un fragmento de este gen.

```
1 GAATTCAACA AAGATTTATA CACGTTCAAGT AAATTACCTA TCAACAGACA
51 AGAGCAACTT GCAGAAGCTG CCAAACACAA AGGTATACAA GATTTGGATC
101 TTGCTCGCGA TTTAAGTCGA TTAACGTTCT CTGCTCATAT TGGTGGTGAT
151 GGTGATAAAG TACAAGCTAA ATCTGTCAAC CATGGTGGA AACAAAGCAGC
201 CTTGTACAAC GTAGCTGATG AACTTGACGA AAATTTCTTC CATTGGAACG
251 GTGTCAAGG CAGACTTAGG AACCCTTTCC ATAAGCAAAC CGTCGCCAAC
301 GAAAATGGTA AGAAGCATAA CAAGAAGAAC AAGAAGAGTA AGAAAAGGC
351 TTCCCATGTT FCCGATTAAT GTAAGACTAT CTAAATTCAT CCTAACTTC
401 TTATATATAT ATAAATCCAC TGTTTGACAA GTCTATPCCC AATCTTCATT
451 ATGGAATGTA ACTGCATATC CTTTATATCT TCCTTAGCTG CCCTGCTTCC
501 GCTTATAAGA CCTATGGTTA GCATGCAACT TCTCACTGCA TTACCCGCTG
551 TTTACTGAAA AATTTGATGA ACCAAAAGAA AAGGATACAA AACTTGGTTA
601 AAGTTGGTTT ACTTTATACT TGACCTCAGT ACATGGTCCA GTTGATAAGT
651 ATTCTTGTC A TTGTTGGTTA TCTTTTGGT TCCTAGCTCA GCAACCAAGG
701 GCTCTTAAAC ACATTCGGC ATGTTCAATT ATGTTTCGCG TTGTGGTTAT
751 CATGGCGCAG ACTTATTC A CGCATGTAGA AGTGAGCTCA AGATGCCAG
801 AGCTGGGATA CTCCATT A ACGCCCTTTT CGCTAACAAAC AACTGAATTC
```

Figura 10.- Secuencia del fragmento clonado de 850 pb. En rojo se muestra la secuencia del fragmento 13df. Esta secuencia delimita el extremo 3' del Marco de Lectura Abierto del gen *Kidf13*. En verde se muestra una parte de la región codificante de *Kidf13*. En el interior de esta secuencia no se encontró ningún codón de inicio de la traducción. Esto sugiere fuertemente que este gen es mucho más largo que lo que se pudo clonar.

Este Marco de Lectura Abierto de 366 b se comparó con un banco de genes. La comparación arrojó semejanzas con varios genes. De estos el más parecido al fragmento *Kidf13* fue un gen de *Saccharomyces cerevisiae* llamado SCYGL099w (ver figura 11). La homología entre el fragmento *Kidf13* y SCYGL099w es de 66.2% en un solapamiento de 355 pb. Esta homología es alta. SCYGL099w codifica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

para una proteínas de 640 aa, cuya función hasta el momento es desconocida. Sin embargo, en estudios funcionales hechos por un grupo de investigadores (Lillo et al, 2000) se muestra que las cepas de levaduras deletadas en el gen SCYGL099 w presentan una menor eficiencia en el apareamiento y en la esporulación que las cepas silvestres.

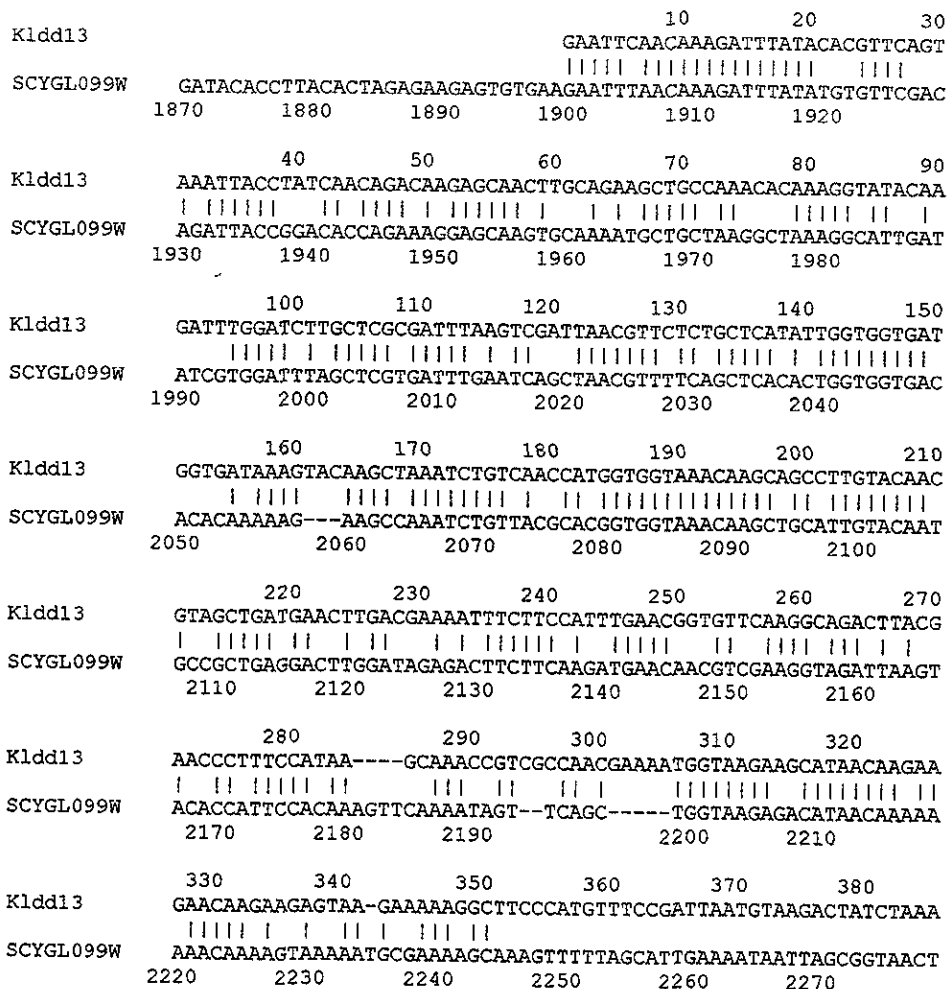


Figura 11 .Comparación de la secuencia de nucleótidos del fragmento Klidd13 con un banco de datos. Se obtuvo la secuencia del fragmento Klidd13 y se comparó con un banco de datos (Genbank). Esta comparación arrojó una semejanza notable entre Klidd13 y una porción del gen SCYGL099w, el cual es un gen de *S. cerevisiae* que codifica para una proteína cuya función bioquímica es desconocida. A su vez, SCYGL099w se parece a un gen de humanos llamado HSR1 y que tiene sitios putativos de unión a GTP. La identidad entre Klidd13 y SCYGL099w es de 66.2% en un solapamiento de 355 pares de bases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultados apuntan en el sentido de que el sistema de transducción de señales desencadenado por feromonas participa en el control de la expresión de YGL099W, de la misma manera que participa en el control de la expresión de genes sexo y haploide específicos en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo se han hecho otros experimentos que muestran resultados de difícil interpretación. Cuando son inactivados Ste12p, Ste4p y Fus3, lo que se observa no es una reducción en la expresión de YGL099W sino una inducción en esta; esos resultados se contraponen con aquellos obtenidos cuando se sobre expresan Ste12p y Ste4p.

Otro resultado interesante es que YGL099W se expresa más en las células alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que en las células de tipo a.

V. PERSPECTIVAS

El gen *Kldf13*, según los datos obtenidos en esta tesis, se trata probablemente de un gen sexo específico de las células *alfa* de *Kluyveromyces lactis*. Para probar esto de manera concluyente el gen *Kldf13* tendrá que ser clonado en su totalidad y deberán realizarse análisis funcionales sobre el papel del producto génico de *Kldf13* en la vida de las células *alfa*. La determinación de la secuencia completa del gen *Kldf13* es de suma importancia. En principio dicha secuencia podría ser comparada con un banco de datos. Los resultados de esta comparación proporcionarían información valiosa sobre el gen en estudio. Por una parte se podría determinar si existen genes con homología alta con el gen *Kldf13*. Si esta fuera la situación se podrían tener datos sobre la probable función de *Kldf13*, en caso de que se conocieran las funciones de sus genes homólogos. La utilización de mutantes inactivos en genes particulares ha sido de gran importancia para conocer el papel que juegan estos genes en los procesos celulares. El gen *Kldf13* podría ser inactivado en células *alfa* a través de la inserción de construcciones formadas por un módulo *KanMx4*, flanqueadas por regiones del gen *Kldf13*, de tal manera que estas regiones recombinaran con el gen *Kldf13*, inactivándolo por la inserción de un elemento exógeno al gen, como es el módulo *KanMx4*. Los mutantes de *K. lactis* producidos de esta manera serían estudiados para definir su fenotipo. Si *Kldf13* es en realidad un gen sexo específico, se esperaría que las células *alfa* mutadas en este gen presentarían alteraciones en el apareamiento. Con este tipo de ensayos se podría determinar si el gen en cuestión está o no implicado en el apareamiento, sin embargo, harían falta otro tipo de experimentos para conocer la función celular de la proteína, es decir, se tendría que definir si la proteína *Kldf13* se trata de un receptor de feromonas, de una aglutinina, de un factor de transcripción, etc. Una de las primeras preguntas que se podrían contestar sería la de la localización celular de la proteína *Kldf13*. Se podría estudiar esta cuestión insertando un gen híbrido, formado por la secuencia de *Kldf13* y por la de la Proteína Verde Fluorescente, en un vector de expresión, el cual sería utilizado para transformar células *alfa* de *K. lactis*. Se localizarían las proteínas híbridas por microscopía de fluorescencia. La localización superficial de la proteína podría sugerir que esta se tratara de un receptor de feromonas o bien de una aglutinina. Si *Kldf13* se tratara de un receptor de feromonas, en su secuencia tendrían que encontrarse 7 dominios transmembranales. Adicionalmente podrían realizarse ensayos de unión para probar interacción entre *Kldf13* y feromona marcada. La localización nuclear de la proteína podría indicar que *Kldf13* se trata de un factor transcripcional. Para examinar esta posibilidad, lo primero que podría hacerse sería determinar si la proteína *Kldf13* presenta o no dominios de interacción con el DNA. Para comprobar que efectivamente la proteína *Kldf13* se trata de un factor de transcripción se necesitaría conocer la secuencia de nucleótidos con la que se une. Conociéndose la secuencia podría insertarse ésta en un vector que contuviera el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor débil. Este vector de expresión sería utilizado para transformar, junto con otro vector de expresión que contuviera el gen *Kldf13*, células *alfa* mutadas en el gen *Kldf13*. Con este tipo de ensayo, se esperaría que las células cotransformadas con ambos vectores presentarían una mayor actividad de luciferasa que las células control transformadas únicamente con el vector con la luciferasa.

VI. CONCLUSIONES

La sonda 13df obtenida a partir de una expresión diferencial permitió la clonación de un fragmento de gen de *Kluyveromyces lactis*, que corresponde al extremo 3' de un Marco de Lectura Abierto y que recibió el nombre de Kldf13. De acuerdo al ensayo de hibridación tipo dot-blot el gen Kldf13 se expresa preferentemente en la cepa WM27, por lo que probablemente se trata de un gen sexo específico. Este resultado de expresión concuerda con el hecho de que la sonda 13df se encontró en la cepa WM27 en la expresión diferencial.

El fragmento de Kldf13 presentó una homología de 66.2% con el extremo 3' del gen YGL099w de *S. cerevisiae*. Esta semejanza sugiere que ambos genes son homólogos, sin embargo, esta conclusión solo podrá ser el resultado de comparar el gen completo Kldf13 con YGL099w. La función bioquímica de la proteína YGL099w se desconoce, sin embargo, se sabe que su presencia es indispensable para el apareamiento. Por otra parte, la expresión del gen YGL099w parece estar bajo el control del sistema de respuesta a feromonas y además su expresión es mayor en las células *alfa* que en las *a* en *S. cerevisiae*. Estos datos son los que uno podría esperar para un gen sexo específico, sin embargo, hay que hacer notar que en la literatura disponible no se menciona que YGL099w se trate de un gen de este tipo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Austen, M. B; and Westwood, M. O. (1991). Protein Targeting and Secretion. Oxford University Press. United States of America

Ballensiefen W; and Schmitt D.H.(1997). Periplasmic Bar1 Protease of *Saccharomyces cerevisiae* is active before reaching it's extracellular destination. Eur J Biochem. 247, 142-147.

Bender, A., and Sprague, F. G (1986). Yeast Peptide Pheromone α -Factor, Activate a Common Response Mechanism in their Target Cell's. Cell. 42, 929-937.

Betz, R; Crabb, W. J; Meyer, E. H; Wittig, R; and Duntz, W. (1987). Amino acid sequences of α - factor mating peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry.262, 546-548.

Blumer, J. K; Reneke, E. J; and Thorer, J. (1988). The STE2 Gene Product is the Ligand Binding Component of the α -Factor Receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry.263, 10836-10843

Botstein, D, and Fink, R. G. (1988). An Experimental Organism for Modern Biology. Science. 240, 1439-1442

Caldwell, A. G; Wan, H. S; Naidler, F; and Becker, M. J(1994). Consequences of Altered Isoprenylation Targets on α -Factor Export and Bioactivity. Proc Natl Acad Sci USA.91, 1275-1279

Capellaro, C; Baldewann, C; Reinhard, R; and Tanner, W. (1994). Mating Type Specific Recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: Cell Wall Attachment and Active Sites of α and *alfa* agglutinin. The Embo Journal.13, 4737-4744

Capellaro, C; Hauser, K; Mrsa, V; Watzele, M; Watzele, G; and Gruner, C. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* α and *alfa* agglutinin: Characterization of their Molecular Interaction. The Embo Journal.10, 4081-4088

Caplan, S; and Kurjan, J. (1991). Role of α Factor and the M α 1 α Factor Precursor in Mating in Yeast. Genetics. 127, 299-307

Cross, F (1988). Conjugation in *Saccaromyces cerevisiae*. Ann. Rev. Cell. Biol. 4, 429-457

Elion, A. E (1995). Ste5. A Meeting Place for Map Kinase and their Associates. Trends in Cell Biology.5, 322-327

BIBLIOGRAFIA

Ferguson, B; Horeck, J; Printen, J; Schultz, J, Stevenson, B J, and Sprague, F. G (1994). The Yeast Pheromone Response Pathway: New Insights and Molecular Biology Research.40, 2283-2288

Fuller, S R, Sterne E R; and Thorner, J (1988). Enzymes Required for Yeast Prolactin Processing. Annual Review of Physiology. 50, 545-562

Grayhack, J. E (1992). The Yeast a1 and MCM1 Proteins Bind a Single Strand of their Duplex DNA Recognition Site. Molecular and Cellular Biology. 12, 3573-3582

Hagen, C. D; McCaffrey, G; and Sprague, F. G (1988). Evidence the Yeast STE3 Gene Encodes a Receptor for the Peptide Pheromone α -Factor Gene Sequence and Implications for the Structure of the Presumed Receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 83, 1418-1422

Herrera, T; y Ulloa, M (1990). El Reino de los Hongos. UNAM. México

Herskowitz, A. N (1994). Reconstitution of a Yeast Protein Kinase Cascade in Vitro: Activation of the Yeast MEK Homologue STE7 by STE11. Proc Natl Acad Sci USA. 91, 3398-3402

Hwang-Shum, J; Hagen, C. D; Jarvis, E: E; Westby A, C; and Sprague, F. G (1991). Relative Contribution of MCM1 and Ste12 to Transcriptional Activation of α and α Specific Genes from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 227, 197-204

Jeansonne, N. E (1994). Yeast as a Model System for Mammalian Seven Transmembrane Segment Receptors. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 206, 35-44

Jones, W. E; Pringle, R. E; and Broach, R. J (1992). The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America

Konopka, B. J; and Fields, S. (1992). The Pheromone Signal Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek. 62,95-108

Kuchler, K. R; Sterne, E; and Thorner, J (1989). *Saccharomyces cerevisiae* STE6 Gene Product: A novel Pathway for Protein Export in Eucariotic Cells. The Embo Journal. 8, 3973-3984

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- Lillo, A. G., Andaluz, E., Cotano, C., Basco, R., Cueva, R., Correa, J. and Larriba, G. (2000). Disruption and Phenotypic analysis of Six Open Reading Frames from the Left Arm of the Chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16, 365- 375.
- Lodish, H.; Berk, A., Zipuroki, L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. Freeman and Company. USA.
- Maniatis, F and Sambrook, J (1987) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
- Manney, R. T. (1983). Expression of the BAR1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae* Induction by the α Mating Pheromone of an Activity Associated with a Secreted Protein. *Journal of Bacteriology* 155,291-301
- McGrath, P.J; and Warshawsky, A (1989). The Yeast STE6 Gene Encodes a Homologue of the Mammalian Multidrug Resistance P Glicoprotein. *Nature*. 34
- Michaelis, S; and Herskowitz, I (1988). The α -Factor Pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is Essential for Mating. *Molecular and Cellular Biology*.8, 1309-1318
- Shaffe, B. W; and Rine, J (1992). Protein Prenylation: Genes, Enzymes, Targets and Functions. *Annu Rev Genet*. 30, 209-237
- Simon, I. M; Strathmann, P. M; and Gautam, N (1991). Diversity of G Proteins in Signal Transduction. *Science*. 252, 802-808
- Smith, L. D, and Johnson, D. A (1992). A Molecular Mechanism for Combinatorial Control in Yeast: MCM1 Protein Sets the Spacing and Orientation of the Homeodomains of an α 2 Dimer. *Cell*. 68, 133-142
- Sor, F; and Fukuhar, H (1989). Analysis of Chromosomal DNA Patterns of the Genus *Kluyveromyces*. *Yeast*.5, 1-10
- Sprague, F. G (1991). Signal Transduction in Yeast Mating. *Trends Genet*. 7, 393-397
- Steden, M; Betz, R; and Duntze, W (1989). Isolation and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Supersensitive to G1 Arrest by The Mating Hormone α -Factor. *Mol. Gen. Genet*. 229, 439-444
- Swinkels, B. M; Van Ooyen, A. J; and Bonekamp, J. F (1993). The Yeast *Kluyveromyces lactis* as an Efficient Host for Heterologous Gene Expression. *Antonie van Leeuwenhoek*. 64, 187-201

BIBLIOGRAFIA

Wesolowski- Louvel, M; Breunig, K. D and Fukuhara, H (1996). *Kluyveromyces lactis* : Biochemistry and Molecular Biology of non Conventional Yeast. Spring Verlag.

Whiteway, S. M; Wu, C; Leew, T; Clarck,K; Forest-Lieuvin, A; Thomas, Y. D; and Leberer Ekkehard. (1995). Association of the Yeast Pheromone Response G Protein $\beta\gamma$ subunits with the MAP Kinase Scaffold Ste5p. Science. 269, 1572-1575

VIII APÉNDICE

Medio LB (1 litro)

| | |
|----------------------|------|
| Extracto de levadura | 5 g |
| Triptona | 10 g |
| NaCl | 10 g |

Medio YPD (1 litro)

| | |
|----------------------|------|
| Extracto de levadura | 10 g |
| Glucosa | 20 g |
| Peptona | 10 g |

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Se agradece el apoyo financiero del CONACYT para la realización de este trabajo.
Donativo 28015N.