



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

“Papel del receptor Ste3p en el sistema de respuesta a feromonas sexuales de la levadura *Kluyveromyces lactis*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

**JOSÉ FRANCISCO TORRES QUIROZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ABRIL 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*A mi padre*

*que me dio todo lo necesario para seguir aquí.*

Esta tesis fue apoyada en parte por el donativo:  
DGAPA-PAPIIT IN209602

# Agradecimientos

A mi familia por haberme apoyado en todos los aspectos a lo largo de mi carrera. Mamá gracias por darme todo y ayudarme a dar mi primer paso.

A Martha y familia, Karla, Monste y su familia y Memo por ser parte de una familia de la que me siento orgulloso y que sin ellos nada sería igual.

Al Doctor Roberto Coria por hacerme parte de su equipo, confiar en mi y enseñarme lo necesario para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

A los miembros del Jurado Dra. Laura Camarena, Dra. Clara Espitia, Dra. Bertha Michel y Dr. Alexander de Luna por sus amables comentarios en la revisión de mi trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Laura, Lupita y Mine por todo su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

A Gerardo Coello de la Unidad de Computo por toda la ayuda y las agradables conversaciones.

A la Unidad de Microscopía por toda la paciencia y ayuda con las imágenes de microscopía confocal.

A todos los miembros del laboratorio Alma y Alejandro que me enseñaron las primeras cosas y siempre fueron una muy agradable compañía. Rosario, Sol, Mary, Laura K. (por toda la paciencia y aclarar todas mis dudas), Rosalinda, Bertha (por ayudarme siempre), Gilberto, Miriam, Rocio, Nancy, Edith, Juan Carlos y Natalie por crear un agradable ambiente donde asistir al laboratorio es una tarea placentera.

A todos mis compañeros de generación por hacer mis estudios muy agradables y que a pesar de todo los considero mis amigos y se que llegarán muy lejos cumpliendo sus metas.

A la Doctora Julieta Rubio y la Maestra Clementina Castro por ser unas excelentes profesoras y maravillosas amigas.

Al Doctor Eduardo García y todo su laboratorio por iniciarme en la investigación y darme bases que no olvidaré.

Al Doctor Federico Bermudez y todo su laboratorio por mi paseo en las neurociencias, en especial a Enrique por todas las cosas aprendidas con él, Israela, Jimena y Miriam por su agradable compañía.

A la familia Pérez Molina por hacerme sentir como un miembro más, y apoyarme en todo siempre que lo he necesitado.

A Rosario por ser una excelente amiga, compañera de carrera y de laboratorio, por compartir muchos de tus momentos felices conmigo. Se que llegarás hasta donde te lo propongas y siempre contarás conmigo.

A Miguel y Luis por sus agradable comentarios de la vida, ayudarme a resolver dudas, y ser mis amigo. La portada y ayuda en el formato de este trabajo aparecen con la autorización del señor licenciado Luis Bernardo Tovar y Romo.

A Cristina por enseñarme que con calma y sin preocupaciones de una u otra forma todo se resolverá.

A Maritrini y Miguel Angel por su ayuda y retomar la amistad.

A Eda por apoyarme en todo momento, las agradables pláticas de la tarde, escuchar con atención lo que tengo que decir y enseñarme que los verdaderos amigos existen en todo momento.

A mi madre Paty Zumarraga por dejarme ser tu hijo y quererme como tal, dejarme entrar en su casa como un miembro más. A Karla Tenorio por ser mi hermanita y hacerme reír tanto.

A Sandra y Ericka por apoyarme, preocuparse por mí en todo momento y ser como mis hermanas.

A Aby y Maru personas como ustedes es lo que se necesita en la vida.

A Aurorita por sus agradables pláticas y enseñarme a hacer mis presentaciones. A sus compañeritos de generación en especial a Juan Carlos y Amanda que a pesar de todo son agradables.

A Sergio por ser el mejor de mis amigos y darme tanto durante todos estos años, sabes que escribir algo es poco.

A Aline la amistad que me has brindado es para toda la vida y esto es sólo un pequeño espacio para darte las gracias de todo.

A Alejandro y Carolina recuperar nuestra amistad ha sido una de las cosas que me impulsó a hacer todo esto más fácil.

A Flor, Anita, Luisa, Hilda, Sergio Corona, Aimé, Olivia, Paco (titi y Fátima), Jacobo, Marco y los que me faltaron pero saben quienes son por acompañarme mientras aprendíamos las cosas que realmente valen en la vida.

A Ivan, Penélope, Alejandro, Yolanda, Vargas y Erick por hacerme pasar ratos tan agradables antes de todo esto.

A Israel y José Ramón por ser mis grandes amigos y compañeros gran parte de mis sanos ratos de esparcimiento.

A mis alumnetos Beto, Alejandro, Osvaldo y Marianita y todos sus demás compañeros por haber aguantado todo este proceso. Espero que las pocas cosas que les pude enseñar les sirvan de algo y puedan llegar a ser unos buenos profesionistas.

A Natalie mi alumna por entender que este proceso requería del tiempo que la descuide. Deseo que esta introducción a la investigación te sea útil a lo largo de tu carrera.

A mis profesores Juan Manuel Becerril, Jesús Estrada, Lourdes Parrodi y el hermano Francisco Flores que a pesar de dedicarse a las Humanidades fueron los responsables de que haya elegido esta carrera y me dieron las bases para poder llegar a cumplir mis metas.

A la señora María de la Garza por apoyarme siempre en todo y haber financiado la impresión de este trabajo.

A Dios por hacer la vida tan interesante y tan entretenida.

A todas las personas que a lo largo de mi vida han sido importantes y que no he podido mencionar por falta de tiempo y memoria, saben que debería de estar su nombre aquí y que son importantes para mi.

# Indice

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Ciclo de vida de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	3
1.2. Transducción de la señal del sistema de respuesta a feromona de <i>S. cerevisiae</i> .	4
1.3. Diferencias en el sistema de respuesta a feromona de <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i> .	6
1.4. Regulación de genes sexo-específicos del sistema de respuesta a feromona de <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i> .	8
1.5. Receptores para feromona en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .	11
<b>2. Objetivo</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>14</b>
3.1. Cepas	14
3.2. Técnicas de DNA recombinante	14
3.3. Amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa	15
3.4. Clonación del gen <i>KISTE3</i>	15
3.5. Purificación del DNA	16
3.6. Purificación de RNA de levadura	16
3.7. Hibridaciones: "Southern blot" y "Northern blot"	17
3.8. Construcciones	17
3.9. Transformación de <i>E. coli</i>	19
3.10. Transformación de levaduras.	20
3.11. Apareamientos Cualitativos.	20
3.12. Ensayo de doble híbrido	20
3.13. Eliminación por reparación del marcador URA3	21
3.14. Captura de imágenes en el microscopio confocal.	22
<b>4. Resultados</b>	<b>23</b>
4.1. Clonación del gen <i>KISTE3</i>	23
4.2. Análisis de la secuencia de <i>KISTE3</i>	24
4.3. Interrupción del gen <i>KISTE3</i>	26
4.4. Fenotipo de la mutante $\Delta Kiste3$	27
4.5. Expresión del gen <i>KISTE3</i>	28
4.6. Fusión del gen <i>KISTE3</i> y la proteína verde fluorescente (GFP)	29
4.7. Interacciones del carboxilo terminal de KISte3p	30
<b>5. Discusión</b>	<b>33</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>40</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>41</b>

## Abreviaturas

5-FOA	Ácido 5-Fluoroórtico
AMP	Adenosín Monofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribunucleico
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCR	Receptore acoplado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
Kbp	Kilopares de bases
LiOAc	Acetato de litio
MAPK	MAP cinasas.
ml	Mililitros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén Glicol
RNA	Ácido Ribonucleico
SD	Medio mínimo para levadura
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tm	Temperatura Media
YPD	Medio rico para levadura



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es un hongo unicelular que puede existir de forma estable como células haploides (que contienen una copia de cada cromosoma), o como células diploides (con dos copias de cada cromosoma). Existen dos tipos de células haploides, las células de sexo **a** y las células de sexo  $\alpha$ . Las células de los dos sexos son morfológicamente idénticas, y sólo se diferencian por la expresión de genes sexo específicos. Tanto las células haploides como las diploides tienen un crecimiento vegetativo en el cual se reproducen por gemación. Sólo cuando se encuentran en el medio dos células del sexo contrario se reproducen sexualmente. Esta forma de reproducción se divide en dos partes, la conjugación y la esporulación<sup>1</sup> (Figura 1).

La conjugación se inicia cuando una célula secreta al medio una feromona, ya sea factor **a** o factor  $\alpha$  según el sexo. Esta feromona se une a un receptor específico para ese factor, lo activa y de esta forma se inicia la transducción de la señal, que tiene como consecuencia la formación de células diploides. El primer evento en la célula estimulada es la interrupción del ciclo celular en la fase  $G_1$ , que causa el crecimiento de proyecciones en el sitio donde se encuentra la mayor concentración de feromona, dando origen a una forma característica de las levaduras llamada "shmoo"<sup>1</sup>. Después de fusionar las membranas citoplasmáticas y los núcleos, las dos células forman diploides.

Las células diploides pueden permanecer así de manera estable. Sólo en condiciones con fuentes pobres de carbono y/o bajo privación de fuentes de nitrógeno, los diploides entran en

meiosis y forman esporas. El proceso de esporulación termina con la formación de ascas, y cada una de ellas contiene cuatro ascosporas haploides, dos de sexo **a** y dos de sexo  $\alpha$  completando el ciclo celular de la levadura.

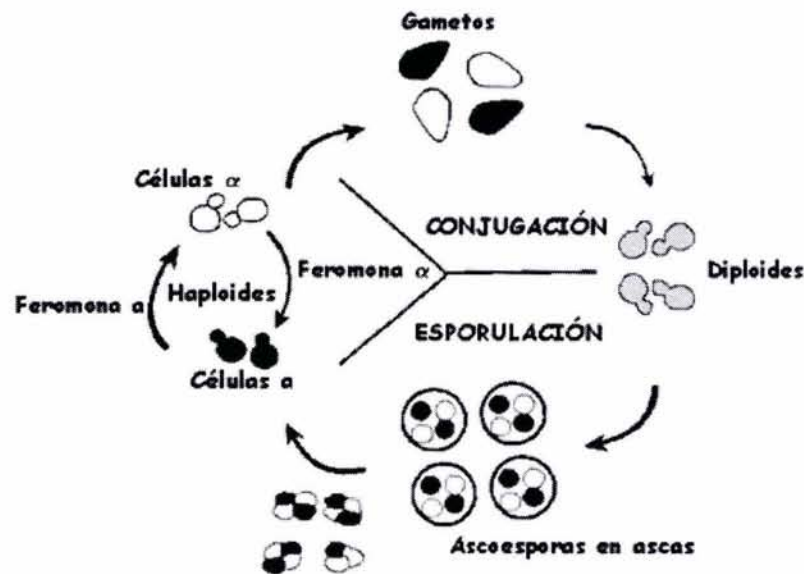


Figura 1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.2. Transducción de la señal del sistema de respuesta a feromona de *S. cerevisiae*.

Para que dos células haploides de diferente sexo puedan llevar a cabo la conjugación, se requiere de la activación del sistema de respuesta a feromona. Los elementos que participan en este sistema y en su función están bien caracterizados en *S. cerevisiae* este es un buen modelo para el estudio de la transducción de las señales mediada por los receptor de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G <sup>2,3</sup>.

Las células haploides expresan receptores para la feromona del sexo contrario, la proteína ScSte2p es el receptor de la feromona  $\alpha$  y la proteína ScSte3p es el receptor de la feromona **a**. Estos son proteínas de membrana que se encuentran acopladas a una proteína G heterotrimérica. El heterotrímico se compone de una subunidad  $G\alpha$ , codificada por el gen *GPA1*, y un dímero formado por  $G\beta$  y  $G\gamma$  que se codifican por los genes *STE4* y *STE18*, respectivamente. Una vez que la feromona se une al receptor del sexo contrario, se induce un cambio conformacional en el receptor que produce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  y ésta, a su vez, se disocia del dímero  $G\beta\gamma$ . Esta señal persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP y las subunidades se vuelven a asociar. La afinidad de  $G\alpha_1^{p}$  por  $Ste4^{\beta}p/Ste18^{\gamma}p$  depende de su unión a una molécula de GDP, esto es, sólo cuando  $G\alpha_1^{p}$  tiene unida una molécula de GDP es afín por  $G\beta\gamma$ . La liberación de  $G\beta\gamma$  activa la señal por medio de varias moléculas efectoras, como la proteína Far1p (adaptadora de Cdc24), la cinasa Ste20p y la proteína de andamiaje Ste5p, para iniciar con las dos últimas una cascada de fosforilación de cinasas de la familia MAPK (Ste11p, Ste7p y Fus3p). La fosforilación de estas cinasas tiene como consecuencia la activación del factor transcripcional Ste12p que reconoce la secuencia denominada PRE ("Pheromone Response Element") presente en la región promotora de los genes de respuesta a feromona los cuales son necesarios para la conjugación <sup>2,3</sup> Figura 2.

Aún cuando el sistema de respuesta a feromona se ha estudiado ampliamente en *S. cerevisiae*, este sistema se conoce muy poco en otras levaduras pertenecientes a los ascomycetes. En nuestro laboratorio estamos interesados en conocer este sistema en la levadura *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), ya que hemos encontrado algunas diferencias interesantes en el funcionamiento de éste sistema entre estas dos levaduras.

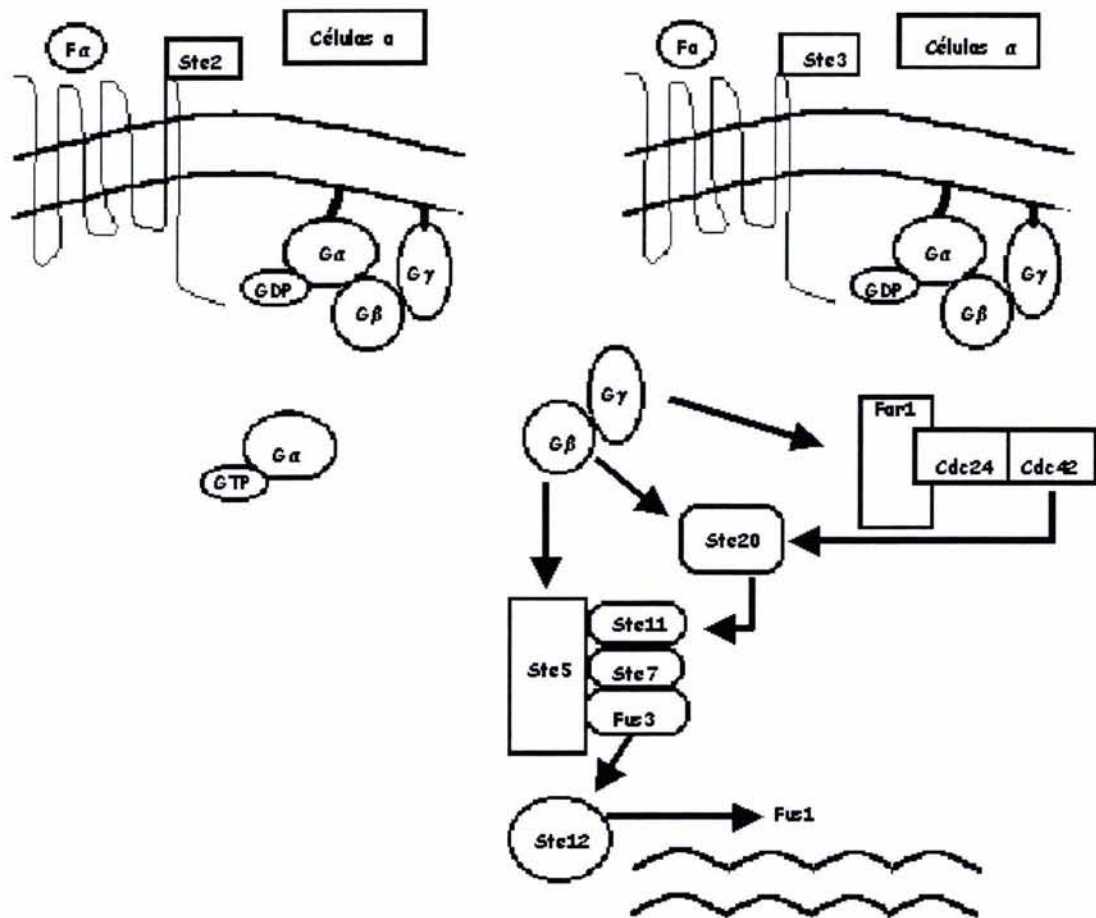


Figura 2. Esquema de la cascada de señalización del sistema de respuesta a feromona de la levadura *S. cerevisiae*.

### 1.3. Diferencias en el sistema de respuesta a feromona de *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

*K. lactis* es una levadura petit negativa, esto es, incapaz de crecer en ausencia de oxígeno con sustratos fermentables. A diferencia de *S. cerevisiae*, esta levadura es esencialmente aeróbica<sup>4</sup>. Fisiológicamente, el proceso de conjugación sexual de estas dos levaduras se lleva a cabo de manera semejante. Como *S. cerevisiae* *K. lactis* también presenta dos tipos celulares denominados **a** y  $\alpha$ <sup>4</sup> y, las células de tipo  $\alpha$  producen un factor sexual  $\alpha$ <sup>5</sup> y se piensa que las células **a** también secretan un factor de tipo **a** que actúa en células del sexo contrario. En el

laboratorio tenemos evidencias de que estas feromonas se secretan al medio como sucede en *S. cerevisiae*<sup>6</sup>, ya que al exponer cultivos celulares de un sexo con filtrados de un medio de cultivo del sexo contrario crecido a saturación, el ciclo celular se interrumpe y las células se arrestan en fase G<sub>1</sub>.

En el laboratorio hemos estudiado el papel que juega KIGpa<sub>1</sub><sup>α1</sup>p, que actúa como una proteína activadora de la señal, ya que las levaduras mutantes  $\Delta Klgpa_1^{\alpha 1}$  son incapaces de formar células diploides cuando se hacen ensayos de apareamiento con células del sexo contrario<sup>7</sup>. Las mutantes  $\Delta Kiste4^{\beta}$ , son también incapaces de aparearse, lo que nos indica que el papel que juegan las subunidades G $\beta$  y G $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica en el sistema de respuesta a feromona de *K. lactis* es indispensable. En contraste, en *S. cerevisiae* las mutantes  $\Delta Scgpa_1^{\alpha 1}$  sufren interrupción del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>. Esto sugiere que la subunidad G $\alpha$  actúa como un regulador negativo de las subunidades G $\beta\gamma$ . Recientemente demostramos que el factor de transcripción KISTe12p participa en este sistema, ya que mutantes  $\Delta Kiste12$  producen un fenotipo de esterilidad. Además, demostramos que este factor es necesario para la transcripción de genes que se requieren para la fusión celular como *KIFUS1*. Esta vía está regulada positivamente por la activación de la subunidad G $\alpha$ <sup>8</sup> Figura 3.

A la fecha hemos identificado y descrito las proteínas que participan en la activación del sistema de respuesta a feromona de *K. lactis* pero, sin embargo, todavía no conocemos a los receptores que reciben la señal del medio y que son los encargados de activarlo.

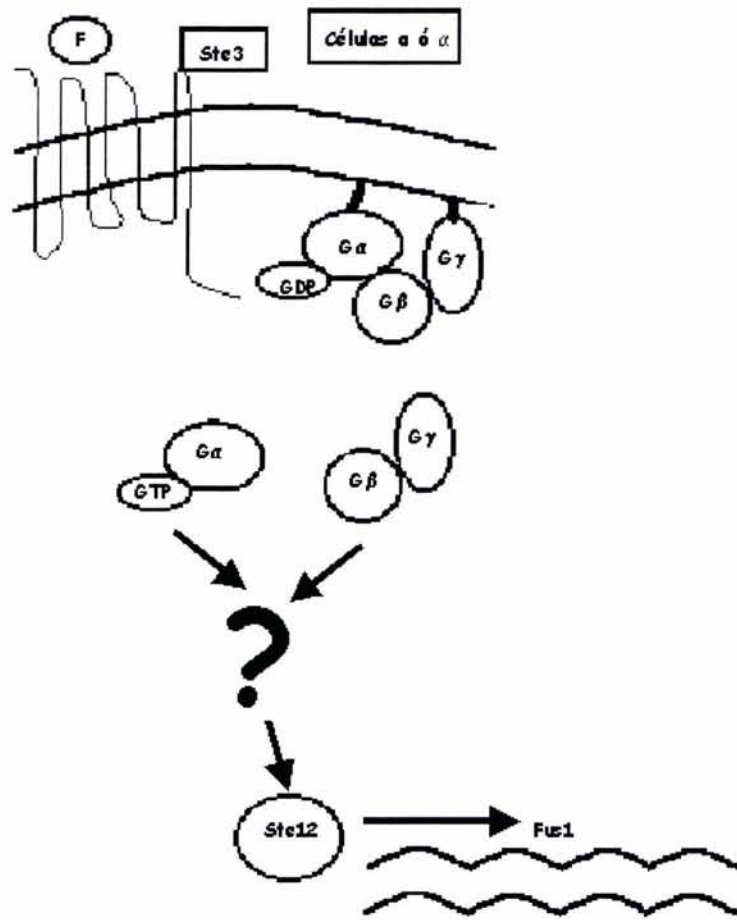


Figura 3. Esquema de la cascada de señalización del sistema de respuesta a feromona de la levadura *K. lactis* con los elementos que hasta el momento se conocen, hipotetizando la existencia de un receptor KSte3p.

#### 1.4. Regulación de genes sexo-específicos del sistema de respuesta a feromona de *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

En *S. cerevisiae*, los genes que determinan el sexo de las células haploides se encuentran codificados en dos alelos del locus *MAT*. *MAT $\alpha$*  codifica dos proteínas, Mat $\alpha$ 1p y Mat $\alpha$ 2p. Mat $\alpha$ 1p junto con la proteína Mcm1p, que se expresa constitutivamente, activa a los genes que son específicos de  $\alpha$ , como la feromona  $\alpha$  y el receptor para la feromona **a**, ScSTE3p. *MAT $\alpha$ 2* codifica una proteína represora que, junto con Mcm1p, Tup1p y Ssn6p, reprime la expresión de genes

específicos de células **a**, tales como el receptor de la feromona  $\alpha$ , ScSte2p y la feromona **a**. Cuando se eliminan los genes *MAT $\alpha$ 1* y *MAT $\alpha$ 2* en células  $\alpha$ , éstas se comportan como si fueran células del sexo **a**, ya que estos genes se expresan constitutivamente y los genes específicos de  $\alpha$  no se transcriben. El *MAT $\alpha$*  tiene dos marcos abiertos de lectura, pero sólo a *MAT $\alpha$ 1* se le ha encontrado un papel biológico. *Mata1p* no tiene función en células haploides, pero en células diploides junto con *Mat $\alpha$ 2p* forma un complejo represor que evita la expresión de genes sexo específico como los que participan en el sistema de respuesta a feromona<sup>9</sup>. Figura 4.

Al igual que *S. cerevisiae*, *K. lactis* tiene dos tipos celulares, **a** y  $\alpha$ , que se determinan por el locus *MAT* y que al conjugarse forman células diploides **a**/ $\alpha$ . Este locus es importante para mantener el sexo en las levaduras. El locus *MAT $\alpha$*  de *K. lactis* codifica para tres genes *MAT $\alpha$ 1* y *MAT $\alpha$ 2*, homólogos a los de *S. cerevisiae*, mientras que *MAT $\alpha$ 3* parece tener un papel en este evento, pero dependiente de *MAT $\alpha$ 1*<sup>10</sup>.

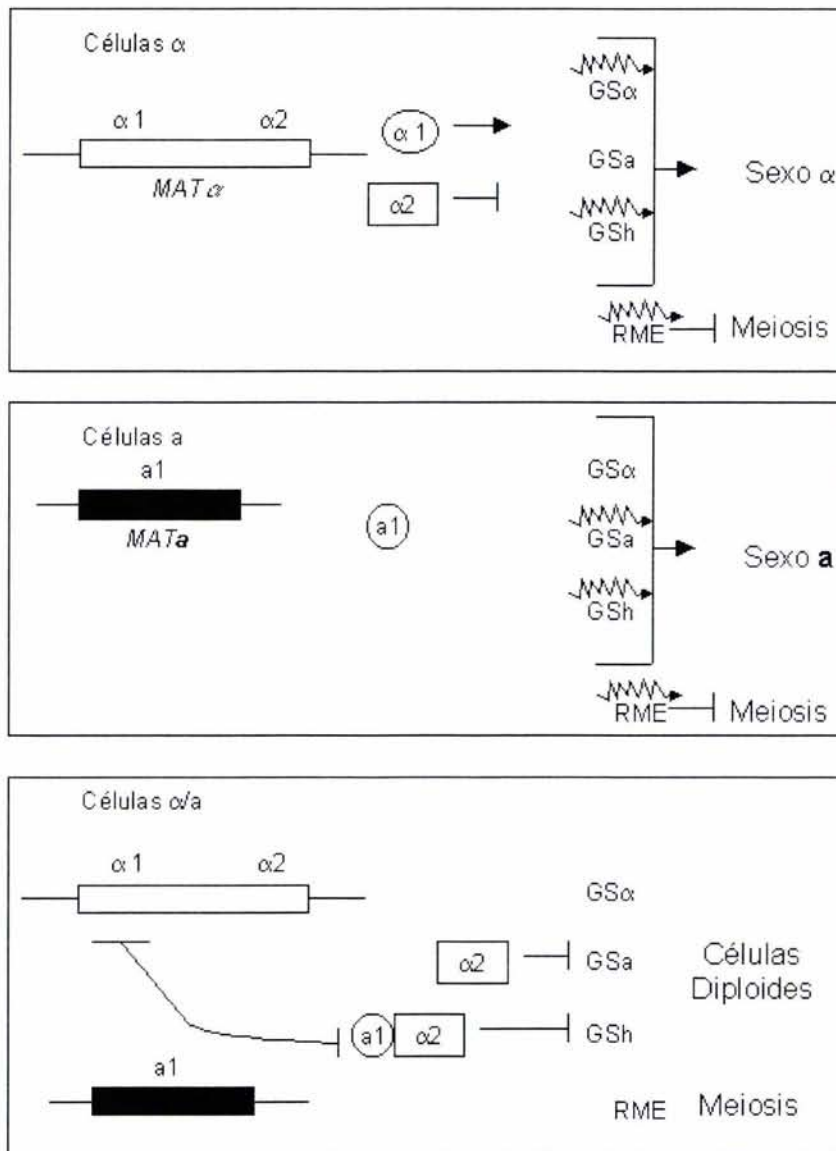


Figura 4. Control de los genes sexo-específicos. En los tres paneles se muestran las proteínas reguladoras codificadas en el locus *MAT* (*Mat $\alpha$ 1p*, *Mat $\alpha$ 2p* y *Mata1p-Mat $\alpha$ 2p*), que controlan la transcripción de los genes específicos (*GS $\alpha$* , genes específicos de  $\alpha$ ; *GSa*, genes específicos de *a*; y *GEH*, genes específicos haploides). La transcripción se indica con las líneas quebradas. Las flechas indican estimulación, y las líneas indican inhibición. *RME* es un gen específico de células haploides cuyo producto inhibe la iniciación de la meiosis.



## 1.5. Receptores para feromona en la levadura *S. cerevisiae*.

En la conjugación sexual de las células haploides **a** y  $\alpha$  de *S. cerevisiae* participan receptores de siete dominios transmembranales. Estos receptores son los responsables de identificar y localizar a las células del sexo contrario para llevar a cabo la conjugación. Las células  $\alpha$  secretan al medio el factor  $\alpha$ , que es un péptido de 13 residuos, mientras que las células **a** secretan el factor **a**, que consta de un péptido de 12 aminoácidos modificado post-traduccionalmente con la adición de un grupo farnesil en el extremo carboxilo terminal. El receptor del factor  $\alpha$ , ScSte2p, se encuentra en la superficie de las células **a**, donde detecta al factor  $\alpha$  y, por lo tanto, a las células del sexo contrario. A su vez, ScSte3p, el receptor del factor **a** localizado en células  $\alpha$ , detecta al factor **a** de las células **a** vecinas <sup>11,12</sup>.

Estos receptores están acoplados a una proteína G heterotrimérica, que es activada por la unión del ligando, encendiendo de esta forma la vía de transducción de la señal que tiene como resultado la inducción de genes específicos de la conjugación sexual. Estos genes provocan la interrupción del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> y alteran la morfología de la célula, culminando en la fusión celular y nuclear de las dos células <sup>2</sup>.

Los receptores para feromona de *S. cerevisiae* pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G. Esta familia se caracteriza por tener el extremo amino terminal en la parte extracelular, cruzar siete veces la membrana plasmática para formar tres asas extracelulares y tres asas intracelulares y tener el extremo carboxilo terminal en el citoplasma <sup>13</sup>.

El acoplamiento de estos receptores a la proteína G heterotrimérica ocurre por medio de su tercer asa intracelular y cuentan con un extremo carboxilo terminal relativamente largo, que a pesar de ser dispensable para la unión del ligando y el acoplamiento de la proteína G heterotrimérica, es esencial para llevar a cabo las funciones reguladoras, tales como la activación de la proteína G <sup>14</sup>, la desensibilización <sup>15</sup> y la endocitosis <sup>16</sup>.

Aunque los dos receptores para la feromona no son similares en su secuencia, ambos activan la misma vía de transducción de señal. Además, la regulación de los dos receptores parece ser similar, al menos a grandes rasgos. Ambos receptores son fosforilados en el extremo carboxilo terminal, y el número de fosforilaciones aumenta después de que se activa el sistema. También, ambos receptores están sujetos a dos formas de endocitosis mediada por ubiquitina en el extremo carboxilo terminal: una constitutiva (independiente de la unión del ligando) y una dependiente de la unión de la feromona <sup>17,18,12</sup>. La única diferencia que se ha encontrado en la fosforilación del extremo carboxilo terminal de estos dos receptores consiste en que la fosforilación de ScSte2p no depende de ninguna de las cinasas de la cascada de señalización, y que la fosforilación de ScSte3p es dependiente de una de las últimas cinasas de la cascada, que es Fus3p <sup>12</sup>.

## 2. OBJETIVO

### Objetivo Principal

Determinar el papel que desempeña el gen *KISTE3* de *Kluyveromyces lactis* en el sistema de respuesta a feromona.

### Objetivos Específicos

Clonar el gen *KISTE3*.

Definir si el gen *KISTE3* corresponde a la familia de genes sexo específicos

Identificar si existe interacción de la proteína KISte3p con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína G heterotrimérica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas

Las cepas utilizadas para realizar este trabajo fueron:

*Escherichia coli*: DH5 $\alpha$ . *supE44*  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hscR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*

Gm33.  $\lambda$ -*in* (*rrnD-rrnE*)1 *dam-3* *sup-85*

*Saccharomyces cerevisiae*: W303-A. *MATa*, *ade1*, *ura3*, *his3*, *leu2*, *trp1*.

*Kluyveromyces lactis*: 155. *MAT $\alpha$* , *ade2*, *his3*, *ura3*.

12/8.*MATa*, *lysA*, *ura3*, *argA*.

$\Delta$ *Klste3*-155 *MAT $\alpha$* ,  $\Delta$ *Klste3*::*URA3*, *ade2*, *his3*.

$\Delta$ *Klste3*-12/8 *MATa*,  $\Delta$ *Klste3*::*URA3*, *lysA*, *argA*.

12/8.*MATa*,  $\Delta$ *Klste3*, *STE3*-GFP::*URA3*, *lysA*, *argA*.

#### 3.2. Técnicas de DNA recombinante

Los métodos convencionales de DNA recombinante y extracción de DNA utilizados en este trabajo se encuentran reportados por Sambrook, J. <sup>19</sup>. Para la producción y mantenimiento de los plásmidos se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (véase Cepas), con la excepción de la construcción para la interrupción del gen que se utilizó la cepa Gm33 que es deficiente en la metilación de

adenina, y así la enzima de restricción *BclI*, que es sensible a metilación, pudo cortar el plásmido para linearizarlo.

### **3.3. Amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa**

El fragmento del gen *KISTE3* (KISTE3-761) descrito en este trabajo, se obtuvo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los protocolos descritos por Dieffenbach <sup>20</sup>. Se utilizaron cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia a amplificar, utilizando como templado el DNA genómico extraído de la cepa silvestre 155 de *K. lactis*. Los oligonucleótidos para amplificar el fragmento fueron: de la posición +258 a +274 5'TGTTGCCAATATCGCAT3' y de la posición +999 a +982 5'TGGGCGTAATTGTCCTG3'. La T<sub>m</sub> calculada para los dos oligonucleótidos fue de 50°C (se determinó utilizando el programa Restriction Map v1.0). La temperatura de "annealing" utilizada fue de 50°C. El tiempo de elongación fue de un minuto y se realizaron 30 ciclos. Se probó una curva con diferentes concentraciones de Mg<sup>++</sup> (0, 1, 2, 4 y 8 mM), y se seleccionó 2mM porque produjo el producto más puro. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.4. Clonación del gen *KISTE3***

Con esta secuencia de 1035 pares de bases, se diseñaron un par de oligonucleótidos con los cuales se amplificó por PCR un fragmento de 761 pares de bases, utilizando DNA cromosomal de

*K. lactis*. Dicho fragmento codifica 253 aminoácidos los cuales tienen identidad del 62% con ScSte3p<sup>21</sup>. El fragmento de 761 pares de bases se utilizó como sonda en una hibridación tipo "Southern", para la cual, se digirió DNA genómico con las enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI* y *PstI*. La digestión con *EcoRI* mostró un fragmento de entre 2 y 3.5 kilopares de bases (Ver Resultados). El DNA digerido con esta enzima, se utilizó para generar un banco genómico. El cual fue analizado por hibridación en colonia. Se obtuvo una colonia positiva la cual se secuenció.

### **3.5. Purificación del DNA**

La purificación de DNA de los plásmidos utilizados se realizó con el kit QUIAprep<sup>MR</sup> siguiendo las especificaciones del fabricante, a excepción del utilizado para los análisis con endonucleasas de restricción, que se prepararon con la técnica de extracción rápida por "TENS-Miniprep"<sup>22</sup>.

El DNA genómico de las levaduras se extrajo siguiendo la técnica de QTP<sup>23</sup>. La purificación de DNA contenido en geles de agarosa se hizo mediante el kit "GeneClean<sup>MR</sup>" siguiendo las especificaciones del fabricante.

### **3.6. Purificación de RNA de levadura**

La extracción de RNA total de levaduras se hizo siguiendo el protocolo de extracción con fenol caliente<sup>24</sup>.

### 3.7. Hibridaciones: "Southern blot" y "Northern blot"

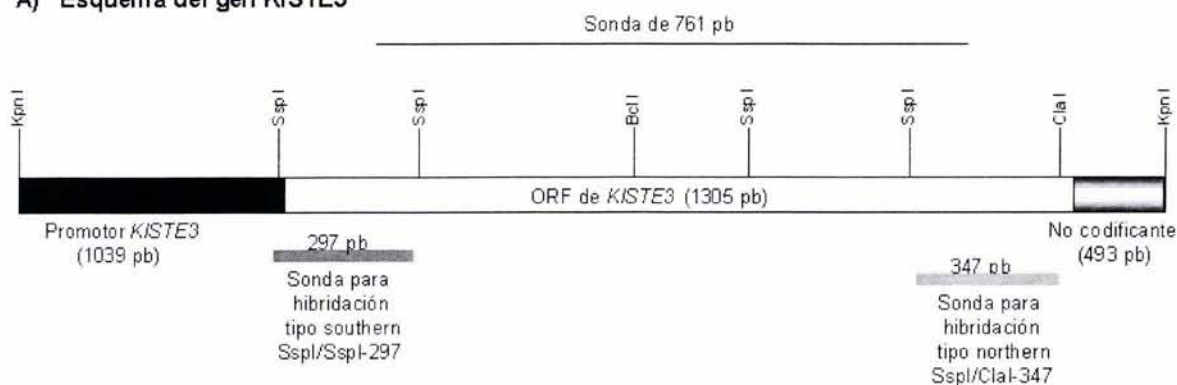
Los geles de DNA y RNA, fueron transferidos a una membrana de nylon y puestos a hibridar con fragmentos de DNA específicos para cada prueba marcados con [<sup>32</sup>P]αdCTP. La sonda fue marcada con el kit de marcaje con oligonucleóticos unidos al azar (Gibco BRL). Las hibridaciones se llevaron a cabo durante toda la noche a 55°C y se lavaron tres veces con SSC 1X (SSC 1X es NaCl 0.15M y Citrato de Sodio 0.015M)-0.5% de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) a 65°C durante 15 minutos.

### 3.8. Construcciones

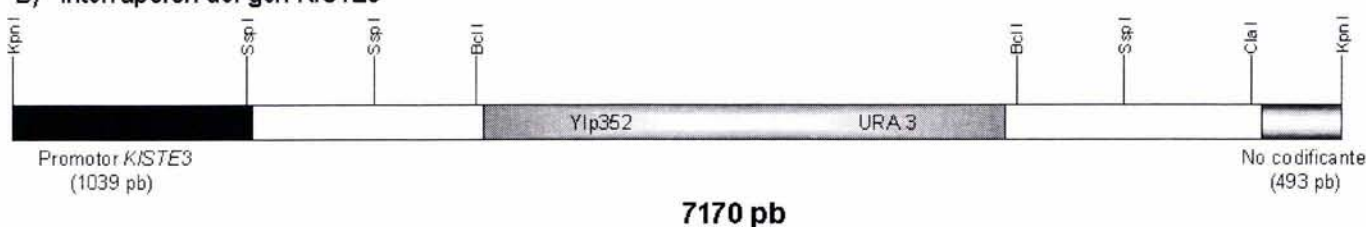
Interrupción del gen *KISTE3*: Esta construcción se realizó con el fragmento KISTE3-761 de 761 pares de bases que se amplificó a partir de la secuencia reportada en el GenBank. Se clonó en el vector para interrupción de levadura YIp352, que contiene el marcador URA3 (Figura 5 B). Se transformaron las cepas 12/8 y 155 (véase cepas), con la construcción linearizada con la enzima *BclI* (véase resultados).

Fusión KISTE3-GFP: Se utilizó el vector de expresión de *K. lactis*, YEpKD352, para clonar la región promotora y el marco abierto de lectura de *KISTE3*, hasta el sitio *ClaI*, y se fusionó con la proteína GFP, que se tomó a partir del plásmido pGAL-sGFP (amablemente facilitado por la Dra. Bertha Michel). Esta fusión fue comprobada por secuenciación para asegurar que se conservaba el marco abierto de lectura (Figura 5 C).

### A) Esquema del gen *KISTE3*



### B) Interrupción del gen *KISTE3*



### C) Fusión *KISTE3*-GFP



Figura 5. A) Esquema del gen *KISTE3*, en este esquema se muestran los sitios de restricción utilizados en el promotor, el marco abierto de lectura y la secuencia río abajo del gen. Con las líneas grises se muestran los fragmentos que se utilizaron como sonda para las hibridaciones tipo "Northern" y "Southern"; así como el fragmento de PCR (*KISTE3*-761) que se utilizó para la búsqueda por tamizaje. B) Esquema de la interrupción del gen *KISTE3*, donde se muestra donde se insertó el módulo con el marcador *URA3* de *S. cerevisiae*. C) Esquema de la fusión *KISTE3*-GFP.

Doble híbrido: La construcción pJG4-5-COOHKISte3 se hizo a partir de la clona que contenía el gen completo, digerido con la enzima *SspI* y tomando el fragmento que corresponde al carboxilo terminal y se fusionó con el vector pJG4-5. Esta construcción fue secuenciada para comprobar que no se perdía el marco abierto de lectura. Las construcciones pEG202- $\beta$ , pEG202- $\alpha_2$ , pJG4-5- $\beta$ , pJG4-5- $\alpha_1$  ya se habían utilizado en el trabajo de Saviñon-Tejeda <sup>7</sup> (Figura 6).



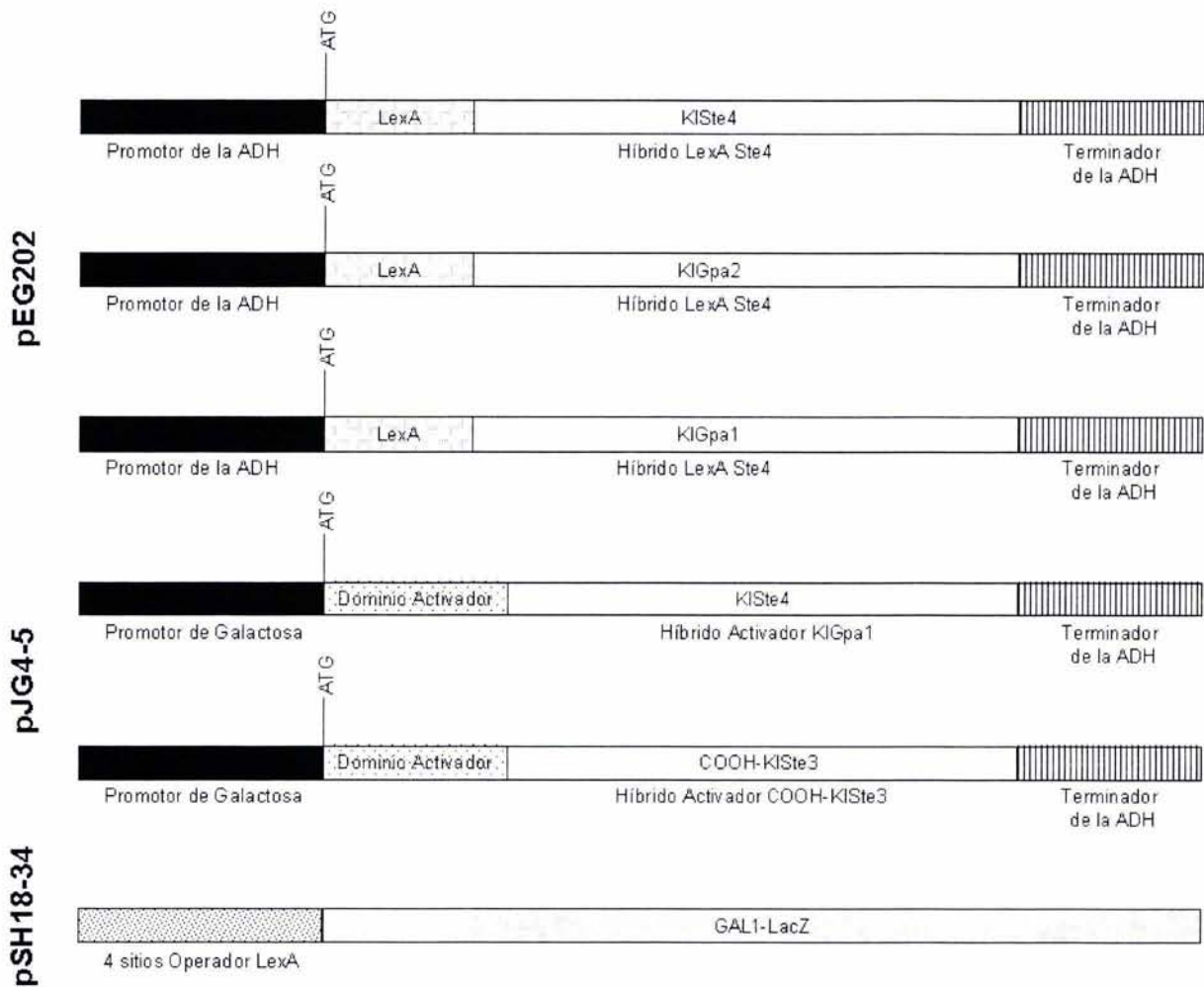


Figura 6. Esquema de las construcciones utilizadas para el ensayo de doble híbrido, donde se muestran las características de cada plásmido, así como las fusiones que contienen.

### 3.9. Transformación de *E. coli*

Se prepararon células competentes de *E. coli* según el protocolo de transformación de alta eficiencia<sup>25</sup>. Las células Gm33 se transformaron con el método de cloruro de calcio<sup>19</sup>.

### **3.10. Transformación de levaduras.**

Se utilizó el método de LiOAc/PEG/DMSO para la transformación de levaduras <sup>26</sup> y se seleccionaron las células transformadas en medio mínimo SD (0.67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) y 2% de glucosa) con los aminoácidos requeridos.

### **3.11. Apareamientos Cualitativos.**

Las células a probar se estriaron en cajas de medio mínimo con los aminoácidos necesarios y se incubaron a 30°C durante 24 horas. La cepa testigo se plaqueó uniformemente en cajas de medio rico YPD y se incubaron bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las dos cajas fueron replicadas por terciopelo en una caja de medio rico YPD a 30°C durante 12 horas. Finalmente, se replicaron las células a una caja de medio mínimo SD, con los aminoácidos necesarios para seleccionar diploides. Se crecieron durante 24 horas a 30°C.

### **3.12. Ensayo de doble híbrido**

Se utilizaron las construcciones pEG202- $\beta$ , pEG202- $\alpha_2$ , pJG4-5- $\beta$ , pJG4-5- $\alpha_1$  y pJG4-5-COOHKISte3 (Figura 6), y el plásmido con el gen reportero pSH18-34 para llevar a cabo el ensayo de doble híbrido (Figura 7). Se cotransformaron células de la cepa W 303-1A de *S. cerevisiae* (véase cepas), poniendo un plásmido de cada tipo (pEG202, pJG4-5 y pSH18-34). Se crecieron en

cajas de SGal (medio mínimo con galactosa como fuente de carbono) +Ade +Leu con X-Gal, se seleccionaron cinco colonias de cada caja y se realizaron ensayos de  $\beta$ -Galactosidasa <sup>27</sup>.

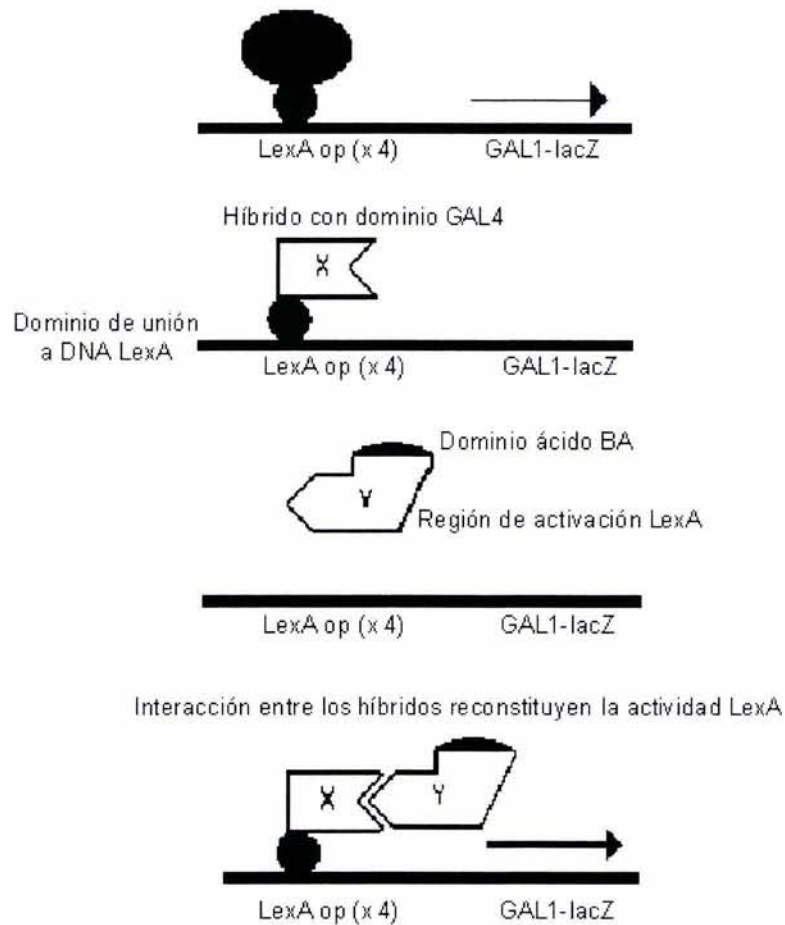


Figura 7. Esquema del sistema de doble híbrido. Este sistema se hace a partir de una proteína que tiene dominio de unión a DNA (LexA) y un dominio ácido (BA) que sirve como activador. Se separa cada dominio de esta proteína y se fusiona con alguna de las dos proteínas que se desean probar para medir una posible interacción. Solamente si estas dos proteínas interactúan, estarán lo suficientemente cerca para poder activar la expresión del gen reportero  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.13. Eliminación por reparación del marcador URA3

Para eliminar el marcador URA3 en la cepa  $\Delta K/ste3::URA3$  (véase cepas), se utilizó el ácido 5-fluoroórtico (5-FOA). Se creció la cepa en cajas de medio mínimo con arginina, lisina y uracilo

(2mg/ml) y 1mg/ml de 5-FOA<sup>28</sup>. Después de haber crecido las colonias se resembraron en medio rico YPD, se probaron marcadores y se probó la esterilidad con ensayos de apareamiento.

### **3.14. Captura de imágenes en el microscopio confocal.**

Se transformaron las diferentes cepas con la construcción YEpKD-KISTE3-GFP y se crecieron durante 24 horas en 10ml de medio mínimo en presencia de los aminoácidos requeridos. Se lavaron 3 veces con agua estéril y se resuspendieron en 1 ml de agua. Para su montaje en cada laminilla se tomaron 5 $\mu$ l de cada muestra y 5 $\mu$ l de medio de montaje para fluorescencia (DAKO® fluorescent mounting medium, DAKO Cytomation).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Clonación del gen *KISTE3*

Se sabe que el gen *ScSTE3* de *S. cerevisiae* está involucrado en el sistema de respuesta a feromona y que codifica para el receptor de la feromona **a**, expresándose sólo en las células de sexo  $\alpha$ . Recientemente, se reportó en el GenBank una secuencia de *Kluyveromyces lactis* (AL428261)<sup>29</sup> que tiene un 52.6% de identidad con el marco abierto de lectura YKL178c de *S. cerevisiae*, que codifica la proteína ScSte3p<sup>29</sup>. Esta secuencia se utilizó como sonda en una hibridación tipo "Southern" con DNA genómico de *K. lactis*. Con base al fragmento que hibridizó se generó un banco genómico (ver Materiales y Métodos) Figura 8. Se obtuvo una colonia positiva que fue secuenciada.

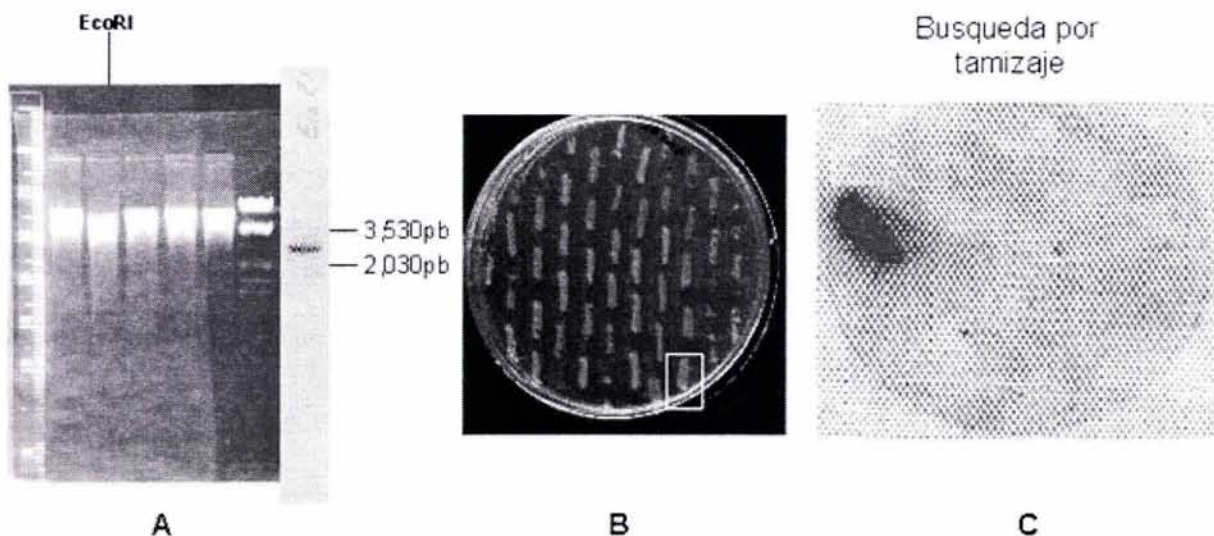


Figura 8. A) Gel e hibridación tipo southern de DNA Genómico de *K. lactis* para identificar el gen *KISTE3*. B) Transformantes obtenidas a partir del minibanco de DNA genómico obtenido a partir de digestiones de DNA genómico de *K. lactis* con la enzima *EcoRI*. C) Colonia positiva en la búsqueda por tamizaje con el minibanco

## 4.2. Análisis de la secuencia de *KISTE3*

La secuencia del gen muestra un marco abierto de lectura de 1308 pares de bases, que codifica una proteína de 435 aminoácidos, con un peso hipotético de 50.07 kDa. La clona contiene también una región de 1076 pares de bases corriente arriba la cual seguramente contiene la región promotora. Se sabe que el receptor ScSte3p pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a una proteína G, por lo que analizamos la secuencia con el programa TMpred<sup>23</sup> para saber si KISTe3p contenía cruces transmembranales. El programa predijo siete cruces transmembranales, que se muestran en la Figura 9.

actgctttatccgaggatgtaccaaagatatttagaagaacttatagacacattatcc  
tgcctctattcctttcccttagtggtttacttttcgaaaagttgatgtatattttaaca  
tgcattaaaggcttaacccggaatctcgattaggtaat ttcattaaaggtccgaattgg  
ttaaagttatggcactgacaataagagtttgggtattaacgtaccaat taggaaggaatg  
gctgggtgaatagagttacatggtatctaggtactaaggaactataaacttattcaaaa  
catgaggttttgaataagttaccccaaaattatataagttgatggggagttgcatagg  
gatgaacaaaaggggttaccatcttgggaactcgagagactatataatgggacagataat  
tgggtgtatgtgtggctcttcagaaaattcacttcttaattgtaccctttcaaatcaaa  
agaactgactattttcttttgcaacagtatcaactaaatcacatcgaatattgata**ATGG**  
M G  
GCTATTCACAATCAATAATAGCACTTAGCGTGATAGCATTGTGTACTTCTACCGCCAT  
Y S Q S **I I A L S V I A F V V L L P P L**  
TAGCATGGCACTCATATACGAGGAATACCCCTGCCATAATTTAATCGTGTGGCTACTAC  
**A W H S Y T R N T P A I I L I V W L L L**  
TTATGAACCTTAAAAGCCATAGTGGATGCGGGCCTCTGGGGTGGTGCTGATTATCAGCAGA  
**M N L K A I V D A G I W G G A D Y Q Q K**  
AATGGTTCCGATATGGCTGGTGTGATGTCATGACAAAACCTCAAATTGGTGCCAATGTGC  
W F G Y G W C D V M T K L Q **I G A N V G**  
GCGTATCCTGTGCTGTTGCCAATATCGCATTCAACTTGCATAGAATATTA AAAAGCTAATA  
**V S C A V A N I A F N L H R I L K A N K**  
AAGAAAATCCCAGATAACCGTTCATGGAAAAAGATTTCGTGTGGATCTCGCTATCAGCTTAG  
E I P D N R S W K K I R V D **L A I S L V**  
TATCCCCGATTGTTATCATGAGCTTGATTTATCTCGTGCAAGTTTTTCAGATTCCGCATAT  
**S P I V I M S L I Y L V Q V F R F G I F**  
TCAGGTATAATGGGTGCCAAAAGCATGTTATCCCCAACTTGGGTCACTACGGTTTTATAACA  
R Y N G C Q S M L S P T W V T T V L Y T  
CCGTATGGATGCTTGTGTGGTCACTTATAGGGTTCATATATGCTTCACTTCTACTTTTCG  
V W **M L V W S L I G F I Y A S L L L F V**  
TATTTTACAAGAAGCGTAAAGATGTCAGGGATATTTTGCATTGCACCAACTCAGGATTGA  
**F Y K K R K D V R D I L H C T N S G L N**  
ACATATCACGCTTTTCGAGATTACTAATCTTTTGTATGGTTATCATCCTGATCATGTTTC  
I S R **F S R L L I F C M V I I L I M F P**  
CGTTCTCTATGTATTTCATTGTTTCGGACTTGAAGAAGTCAGCCCCACGTACCGTCATT  
**F S M Y S F V S D L K N V S P T Y R H Y**  
ATAGCTTCAAAGAAACGCACAATAGTGCTTTATGGAACGTGATATTACATTTTCGATCCTG  
S F K E T H N S A L W N V I L H F D P G  
GTC AACCATTTGTACAGTGTATGGCTGTACATAGTTATGTCCTACCTGGTATTCTTAATAT  
Q P L Y S **V W L Y I V M S Y L V F L I F**  
TCGGACTTGGATCTGATGCATTAACATGTATGCAAACCTCCTCAGAACCATCGGACTTG  
**G L G S D A L N M Y A N F L R T I G L G**  
GTGTAGTGATTGATTCTATTACGGATTGGAGAATCAAGCACAAGGATACGCGCGTCGGTA  
V V I D S I T D W R I K H K D T R V G K  
AAATCACTGAAAAGATTCTACCTAACAAACCCCAACAGCAGGACAATTACGCCCAATTCT  
I T E K I L P N N P Q Q Q D N Y A Q F Y  
ATTGCCGTAGCTCATCTGATGGTGTGCGTACAAATGTCCGATTATTCCGAAAAGATGGACT  
C R S S S D G V V T M S D Y S E K M D S  
CCCCAAGTTCCCCATCACAAATTTGAAATTGATTATACGTTACCCCATGAAAAGAAACATGA  
P S S P S Q F E I D Y T L P H E R N M K  
AGAACTATGATCCTCATAATCAATATGAAATAGATCCTAAATTATCGATATTTTCCCATT  
N Y D P H N Q Y E I D P K L S I F S H S  
CTATCTCTCATGACAGCGATGCATCATCAGAACTTGATACTCCAAATGCAATGGGTAACG  
I S H D S D A S S E L D T P N A M G N E  
AATCTAATCAGTTGCAATATCACTACAGACTAGATCGTTCGCTAAAtcttgtgttttttaac  
S N Q L Q Y H Y R L D R R \*

Figura 9. Parte de la secuencia de la clona que contiene el gen KISTE3 donde se muestra el marco abierto de lectura de la proteína. En rojo se muestra el ATG inicial y los aminoácidos subrayados y en negritas muestran los cruces transmembranales predichos con el programa Tmpred.

La secuencia se alineó con *ScSTE3* de *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró que tienen 55.5% de identidad a nivel de nucleótidos y que a nivel de aminoácidos tienen una identidad de 50.93%. Las regiones transmembranales y la tercer asa citoplásmica son las más conservadas entre las dos especies (Figura 10).

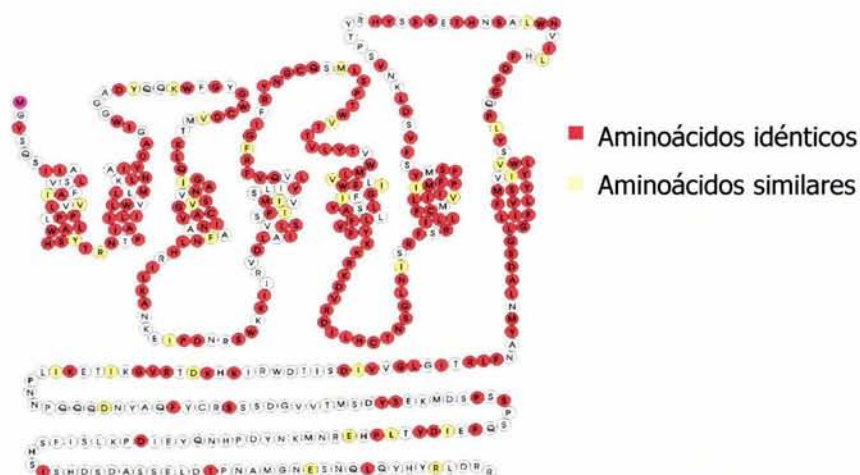


Figura 10. Esquema del receptor K1Ste3p indicando su posible estructura y los aminoácidos que se conservan entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Los aminoácidos en círculos rojos indican los aminoácidos idénticos y los amarillos los que tienen propiedades similares.

### 4.3. Interrupción del gen *KISTE3*

Con el fin de determinar el fenotipo que produce la falta de este gen en las levaduras, interrumpimos a *KISTE3* en ambos sexos (ver Materiales y Métodos). Se tomaron cinco colonias de cada sexo, se crecieron en medio YPD líquido, se extrajo el DNA genómico de cada colonia, y se cortó con la enzima de restricción *KpnI*, que genera un fragmento de 2867 pares de bases, que contiene todo el gen y parte del promotor. Se utilizó como sonda el fragmento *SspI/SspI-297* (Figura 5). En la cepa silvestre encontramos una banda de 2867 pares de bases, y en las colonias interrumpidas la suma del vector (4303 pares de bases) y el fragmento *KpnI/KpnI* que son 7170 pares de bases (Figura 11).



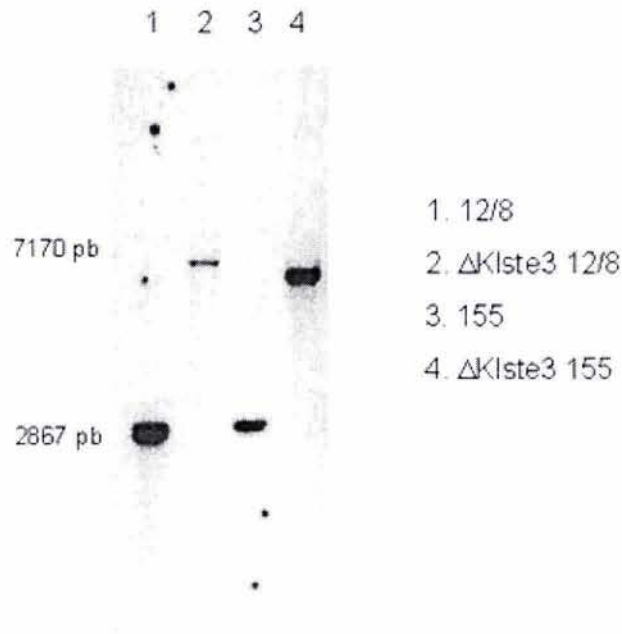


Figura 11. Hibridación tipo Southern para identificar las clonas que contenían la construcción para interrumpir el gen *KISTE3*. En los carriles 1 y 3 se observa el fragmento de 2867 pares de bases que se encuentra en las cepas silvestres. En los carriles 2 y 4 la banda es de 7170 pares de bases, lo que indica que estas colonias tienen integrada la construcción y por lo tanto, interrumpido el gen *KISTE3*.

#### 4.4. Fenotipo de la mutante $\Delta Klste3$

En *S. cerevisiae*, la falta de *ScSTE3* en las células de sexo  $\alpha$ , causa la esterilidad de éstas, ya que son incapaces de percibir en el medio a la feromona **a** y la cascada de señalización nunca se inicia<sup>30</sup>. Por lo anterior, decidimos ver si en *K. lactis* sucedía algo semejante. Para saber si *KISTE3* está involucrado en el sistema de respuesta a feromona y, además, si también es sexo específico como en *S. cerevisiae*, se realizaron ensayos de apareamiento con las células  $\Delta Klste3$  de ambos sexos. Observamos que la cepa 12/8 (tipificada como *MATa*), al tener interrumpido el gen *KISTE3*, es incapaz de aparearse (Figura 12B). Por otro lado, la cepa 155 (tipificada como *MAT $\alpha$* )

no tiene ningún fenotipo en el apareamiento, lo que indica que esta cepa no necesita este receptor para aparearse (Figura 12A).

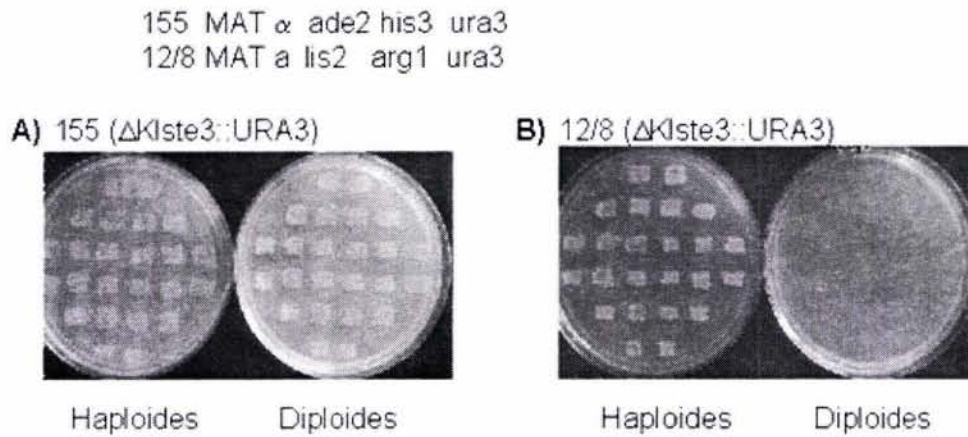


Figura 12. Ensayo de apareamiento con cepas de ambos sexos con el gen KISTE3 interrumpido.

#### 4.5. Expresión del gen *KISTE3*

Para determinar si la expresión del mensajero es específica de la cepa 12/8, se realizó una hibridación tipo "Northern", con el RNA de las cepas interrumpidas y silvestres, de ambos sexos. Se utilizó como sonda el fragmento *SspI/ClaI*-347 (Figura 5). Como se muestra en la figura 13, la única cepa que expresa el mensajero es la 12/8 silvestre, siendo este de un peso aproximado de 1.35 Kpb.

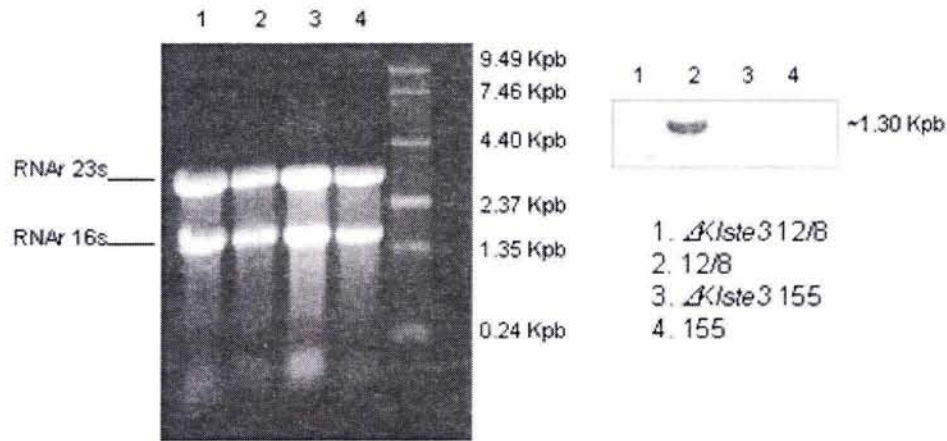


Figura 13. Hibridación tipo Northern con las cepas silvestres e interrumpidas en el gen *KISTE3* de ambos sexos, para identificar las cepas que expresan el mensajero. En los carriles 2 y 4 se corrió el RNA total de las cepas silvestres y en los carriles 1 y 3 de las células  $\Delta Kiste3$ . Como podemos ver el único carril que dio positivo en la hibridación fue el 2 lo que nos indica que *KISTE3* es un gen sexo específico.

#### 4.6. Fusión del gen *KISTE3* y la proteína verde fluorescente (GFP)

Con el objetivo de localizar en la célula al receptor *KISte3p*, se hizo una fusión traduccional entre *KISte3p* y la proteína verde fluorescente para analizar las células transformantes con esta construcción en el microscopio confocal. Se transformó la cepa  $\Delta Kiste3$ -12/8 (previamente tratadas con 5-FOA), con la construcción *YEpkD-KISte3-GFP* que contiene el marcador *URA3*. Esta fusión contiene toda la proteína *KISte3p* a excepción de los 33 últimos aminoácidos del carboxilo terminal, que fueron sustituidos por la GFP (Figura 5). Hicimos un ensayo de apareamiento para saber si se podía recuperar el fenotipo y observamos que las células transformadas fueron capaces de aparearse como ocurre con la cepa silvestre (Figura 14). Posteriormente, las células transformadas se fijaron y se analizaron en el microscopio confocal, y pudimos observar en algunas células, que la fluorescencia se localiza en la membrana plasmática (Figura 15).

12/8 (*Mata*,  $\Delta$ *Kiste3*:URA3 [KISTE3p-GFP])

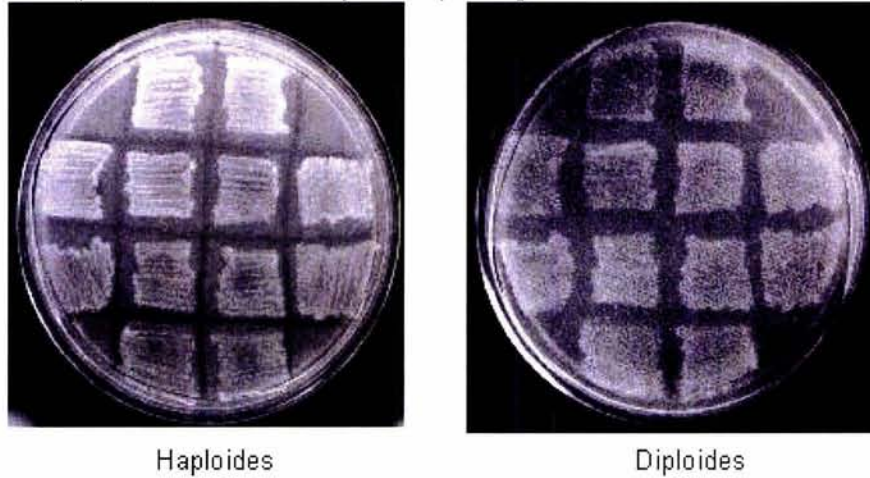


Figura 14. Ensayo de apareamiento de la cepa 12/8 con el gen KISTE3 interrumpido y reconstituido con el plásmido que contiene la fusión del receptor KISTE3-GFP.



Figura 15. Imagen del microscopio confocal de una célula gemante de la cepa 12/8 que muestra la expresión de la proteína de fusión KISTE3-GFP en la membrana plasmática.

#### 4.7. Interacciones del carboxilo terminal de KISTe3p

Con el antecedente de que el extremo carboxilo terminal de ScSte2p de *S. cerevisiae* interactúa con las subunidades ScSte4<sup>Gβ</sup>p y ScGpa1<sup>α1</sup>p de la proteína G heterotrimérica<sup>14</sup> con el fin de investigar si con KISTe3p sucedía algo semejante, se utilizó el ensayo del doble híbrido (Figura 7), para medir las interacciones del carboxilo terminal de KISTe3p, que contiene la región

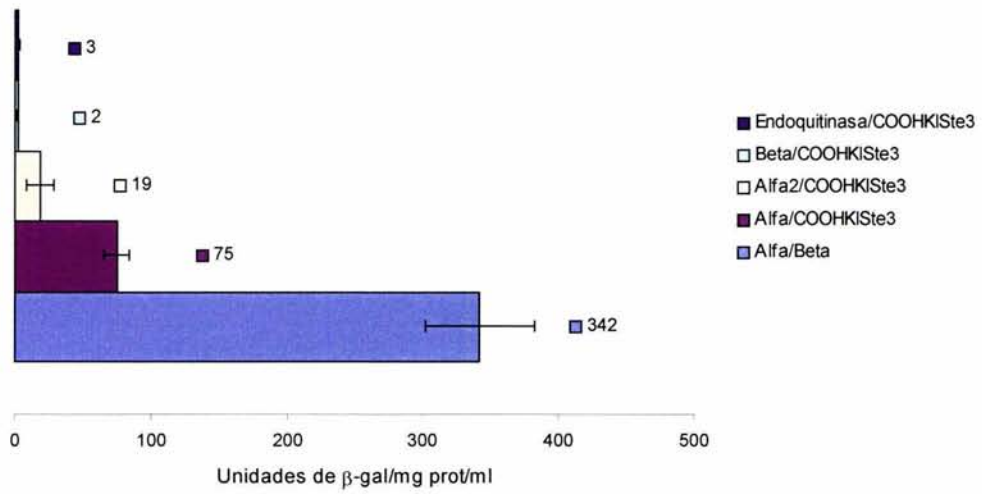
del receptor en los últimos 151 aminoácidos del receptor. Es importante recalcar que esta región de acuerdo al programa de predicción de cruces transmembranales no cruza la membrana y se localiza en el citoplasma (Figura 9). Se midió la asociación entre el extremo carboxilo terminal de KISTe3 con las subunidades KIGpa<sub>1</sub><sup>Gα1</sup>p y KISTe4<sup>Gβ</sup>p de la proteína G heterotrimérica, la subunidad KIGpa<sub>2</sub><sup>Gα2</sup>p la cual participa en la regulación de los niveles de AMP cíclico de la célula,<sup>31</sup> y la proteína endoquitinasa que se utilizó como control negativo. Se midió la expresión del reportero β-Galactosidasa. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Dominio de Unión a DNA Lex A+	Dominio de activación BA+	Actividad de β-Galactosidasa (U/mg/ml) × 10 <sup>-3</sup>
KISTe4 <sup>Gβ</sup> p	KIGpa <sub>1</sub> <sup>Gα1</sup> p	342 ± 40
KIGpa <sub>1</sub> <sup>Gα1</sup> p	COOH-KISTe3p	75 ± 9
KIGpa <sub>2</sub> <sup>Gα2</sup> p	COOH-KISTe3p	19 ± 10
KISTe4 <sup>Gβ</sup> p	COOH-KISTe3p	2 ± 1
Endoquitinasa	COOH-KISTe3p	3 ± 1

Tabla 1. Tabla de resultados del ensayo de β-Galactosidasa que muestran las proteínas que se utilizaron para medir su asociación y los valores del ensayo de actividad de la enzima β-Galactosidasa.

Utilizamos como control las subunidades α y β, ya que Saviñon-Tejeda y colaboradores reportaron que hay un alto grado de interacción entre estas dos subunidades<sup>7</sup>. Encontramos que no existe interacción entre el carboxilo terminal de KISTe3p y KISTe4<sup>Gβ</sup>p. Sin embargo, existe una interacción entre KIGpa<sub>1</sub><sup>Gα1</sup>p y el carboxilo terminal de KISTe3p, que es mucho mayor que la detectada entre el carboxilo y KIGpa<sub>2</sub><sup>Gα2</sup>p (Gráfica 1).

## Actividad de $\beta$ -Galactosidasa



Gráfica 1. Actividad específica de  $\beta$ -Galactosidasa, donde se muestra el grado de asociación que tiene cada subunidad con el extremo carboxilo terminal de KlSte3p

## 5. DISCUSIÓN

El sistema de respuesta a feromona de la levadura *K. lactis* ha demostrado tener diferencias notables en la forma de transducir la señal con respecto a *S. cerevisiae*. Las diferencias más notables están en el papel que juega la proteína G heterotrimérica. En *S. cerevisiae* la subunidad ScGpa<sub>1</sub><sup>α1</sup>p tiene un papel inhibitorio en el sistema<sup>32</sup>. Una mutante que no expresa ScGpa<sub>1</sub><sup>α1</sup> no es viable, ya que se detiene el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> debido a que las subunidades activadoras, el dímero βγ (Ste4p/Ste18p), activa el sistema constitutivamente. Por otro lado la pérdida de función de los genes ScSte4<sup>β</sup> o ScSte18<sup>γ</sup> provocan la esterilidad de las células, es decir son incapaces de aparearse<sup>33</sup>. En contraste en *K. lactis*, KIGpa<sub>1</sub><sup>α1</sup> es un activador del sistema ya que la pérdida de este gen no causa interrupción del ciclo celular, pero sí la esterilidad de las células. Por otro lado, la pérdida de KISTe4<sup>β</sup> también impide a las células la formación de diploides. Esto nos indica que tanto KIGpa<sub>1</sub><sup>α1</sup> como KISTe4<sup>β</sup> juegan un papel de activación en el sistema de respuesta a feromona.

El primer elemento de este sistema es un receptor de siete dominios transmembranales. Existen dos receptores que son sexo específicos, ScSte2p receptor de la feromona α y ScSte3p receptor de la feromona a. Con base en la secuencia de un fragmento del gen de *K. lactis* reportada en el GenBank<sup>29</sup>, la cual presenta una identidad del 62% a ScSte3p, clonamos y comparamos el gen KISTE3 con su homólogo de *S. cerevisiae*.

El análisis de la secuencia de aminoácidos del gen KISTE3 muestra que existe una alta homología con ScSte3 (50.93% de identidad), siendo las regiones transmembranales y la tercer asa citoplásmica, con una similitud del 100% las más conservadas. Por otra parte, el receptor para feromona más estudiado es ScSte2p y estudios en este receptor han determinado que el dominio

del receptor involucrado en la unión al ligando es la parte extracelular del cuarto cruce transmembranal. Los dominios responsables de interactuar con la proteína G heterotrimérica son la primer y tercera asas citoplásmicas, y el segundo y tercer cruces transmembranales <sup>34</sup>. Las secuencias primarias entre ScSte2p y ScSte3p tienen una identidad de menos del 20%, sin embargo, ambos receptores son capaces de acoplarse y activar a la misma proteína G heterotrimérica. Si comparamos la carga de los aminoácidos de las regiones importantes para el acoplamiento de la proteína G heterotrimérica por separado, encontramos que las cargas por región son semejantes en los dos receptores. La tercer asa citoplásmica del receptor ScSte2p tiene más aminoácidos con carga positiva, <sup>35</sup> la secuencia de la tercera asa RSRRFLGLKQFDSFHIL contiene cuatro aminoácidos cargados positivamente (aminoácidos subrayados). Se sabe que esta asa interactúa con la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica cuyo extremo carboxilo está cargado negativamente <sup>36</sup>. La secuencia de la tercer asa citoplásmica de ScSte3p tiene un alto contenido en aminoácidos cargados positivamente (KKRKDVRDILHCTNSGLNLTRFAR con siete aminoácidos cargados positivamente analizando la secuencia de aminoácidos con el programa TMpred). En *K. lactis*, la secuencia de la tercera asa de KISTe3p, KKRKDVRDILHCTNSGLNISR contiene seis aminoácidos cargados positivamente. Podemos especular que la tercer asa de KISTe3p tenga una función similar a la de ScSte3p. Por otra parte, las subunidades  $\alpha$  de *K. lactis* y *S. cerevisiae* tienen una similitud del 72% <sup>7</sup> y, aunque no se ha comprobado experimentalmente, es muy probable que esta tercer asa citoplásmica del receptor de *K. lactis* interactúe con KIGpa<sub>1</sub> <sup>$\alpha$ 1</sup>p, ya sea acoplándose a ella y/o activándola. Tomando en cuenta los antecedentes que se tienen de ScSte2p, era de esperarse que las regiones transmembranales del receptor fueran las más conservadas, ya que son estos dominios los que se han involucrado en varias funciones del receptor, como dimerización, interacción con el ligando y transporte hacia la membrana citoplásmica <sup>34</sup>. Además, al ser regiones que se insertan en membrana tienen que ser hidrofóbicas.



Por otro lado, el extremo carboxilo terminal de K1Ste3p es la región menos conservada comparándolo con ScSte3p, lo cual puede deberse a que los sistemas funcionan de forma distinta, siendo las subunidades K1Gpa<sub>1</sub><sup>α1</sup>p y K1Ste4<sup>β</sup>p de la proteína G heterotrimérica activadoras en el sistema de respuesta a feromona en *K. lactis*.

En estudios recientes se encontró que ScSte2p contiene en el primer cruce transmembranal un dominio GXXXG de la glicoforina A, que es una proteína transmembranal con un sólo cruce que forma dímeros por medio de este dominio <sup>37</sup>. Se sabe que este dominio participa en la oligomerización de ScSte2p y que varios receptores de siete dominios transmembranales contienen este dominio en alguno de sus cruces transmembranales. Mutantes de ScSte2p en esta región no tiene defectos en señalización ni en la unión del ligando, pero sí en el transporte del receptor hacia la membrana plasmática y en la oligomerización <sup>38</sup>. Si analizamos los cruces transmembranales de K1Ste3p encontramos una región semejante al dominio GXXXG en el tercer cruce transmembranal, cuya secuencia es **IGANVGVSCAVANIAFNL**; esta región del tercer cruce transmembranal de K1Ste3p podría ser el dominio implicado en la oligomerización e importación del receptor a la membrana.

Las células haploides de *S. cerevisiae* son **MATa** o **MATα**; estos tipos celulares pueden aparearse y formar células diploides. El sexo de las levaduras se determina por la expresión de alguno de los alelos que se encuentran en el locus *MAT*. El alelo **MATα** codifica para dos proteínas: Matα1p activa la expresión de genes específicos de las células α como el receptor ScSte2p y la feromona α y por medio de su unión con la proteína Mcm1, y Matα2p reprime la expresión de genes necesarios para las células a como el receptor ScSte3p y la feromona a. El alelo **MATa** codifica para la proteína Mata1p que junto con MATα2 forma un complejo represor en células

diploides y de esta manera evita la expresión de genes que son específicos de células haploides <sup>9</sup>. Lo anterior indica que existen una serie de genes sexo específicos y también genes específicos de células haploides. Dentro de los genes sexo específico se encuentran los receptores para las feromonas, los precursores de las feromonas y los genes involucrados en la expresión o represión de genes sexo específicos.

Interrumpimos el gen *KISTE3* en ambos sexos y realizamos ensayos de apareamiento. Con estos experimentos probamos que KISTe3p participa en el sistema de respuesta a feromona, ya que las células MATa interrumpidas en el gen *KISTE3* son estériles, mientras que las células Mat $\alpha$  con la misma interrupción son capaces de aparearse normalmente. Lo anterior indica que *KISTE3* no tiene ningún papel en el sistema de respuesta a feromona de células Mat $\alpha$ , sugiriendo que puede ser un gen sexo específico. Esto se confirmó por la falta de mensajero en células Mata cuyo gen *KISTE3* se encontraba interrumpido y en células Mat $\alpha$  silvestres. A diferencia de ScSte3p, que se expresa en células  $\alpha$  y es el receptor para el factor a. KISTe3p se expresa en células tipificadas como a y es por lo tanto el receptor para el factor  $\alpha$ .

KISTe3p es el receptor para la feromona  $\alpha$  y por lo tanto tiene que ser una proteína que se localiza en la membrana plasmática. Para comprobar si realmente KISTe3p es una proteína de membrana realizamos la expresión de la proteína de fusión KISTE3-GFP en las células que carecen de receptor funcional y realizamos ensayos de apareamiento. Las células que contenían la fusión KISTE3-GFP fueron capaces de recuperar el fenotipo de fertilidad, lo que nos indica que KISTe3p esta involucrado en el sistema de apareamiento y que la fusión con GFP no altera la función del receptor. Además, nos sugiere de forma indirecta que KISTe3p se expresa en la membrana,

aseveración que confirmamos con las imágenes de microscopía confocal que nos muestran que la proteína KISte3-GFP esta en su mayoría en la membrana plasmática de las levaduras.

Las interacciones del extremo carboxilo de KISte3p resultaron ser bastante interesantes. En *S. cerevisiae*, Ongay-Larios y colaboradores por ensayos de doble híbrido con el receptor ScSte2p, mostraron que el extremo carboxilo terminal de ScSte2p interacciona de manera similar con las subunidades ScGpa1<sup>α</sup>p y ScSte4<sup>β</sup>p<sup>14</sup>. Sin embargo, en *K. lactis* encontramos que no existe interacción aparente entre el extremo carboxilo terminal del receptor y la subunidad KISte4<sup>β</sup>p y en cambio la subunidad KIGpa2<sup>α2</sup>p, que parece no participar en el sistema de respuesta a feromona<sup>31</sup> tiene una interacción que es significativamente mayor al control negativo y a la subunidad KISte4<sup>β</sup>p. Lamentablemente, no existen ensayos de interacciones con el extremo carboxilo terminal de ScSte3p, motivo por el cual no son comparables los resultados obtenidos con ScSte2p y KIste3p debido a que son receptores diferentes y no podemos saber si la diferencia que tienen en la afinidad por la subunidad beta es específica del receptor ScSte2p o es una diferencia entre los dos sistemas. Tomando en cuenta que las secuencias de los receptores ScSte2p y ScSte3p difieren considerablemente y que sin embargo, activan la misma cascada de señalización y que tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$  de la proteína G heterotrimérica son proteínas efectoras en *K. lactis*, creemos que la diferencia en la asociación entre ScSte2p y KISte3p por la subunidad  $\beta$  se debe a que la transducción de la señal es diferente en estos dos sistemas, ya que KIGpa1<sup>α1</sup>p es una molécula activadora del sistema.

Con los elementos que ya tenemos identificados en el sistema de respuesta a feromona de *K. lactis*, sabemos que la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G heterotrimérica actúa como un activador positivo del sistema <sup>7</sup>. Las mutantes que no expresan  $KIGpa_1^{\alpha 1}p$  tienen una menor formación de diploides comparados con la cepa silvestre y un alelo activo dominante, estimula a las células haploides al apareamiento. El que la subunidad  $G\alpha$  sea activador contrasta con *S. cerevisiae* donde se activa por medio del dímero  $G\beta\gamma$  <sup>33</sup>. También sabemos que  $KIFus1p$  es uno de los genes que se activan al prender el sistema, y puede funcionar como gen reportero del sistema <sup>8</sup>. En este trabajo demostramos que  $KISte3p$  actúa como el receptor de la feromona  $\alpha$ , que se expresa en células **a** y, posiblemente, uno de los dominios que utiliza para interactuar con la subunidad  $KIGpa_1^{\alpha 1}p$  se localiza en su extremo carboxilo terminal (Figura 16).

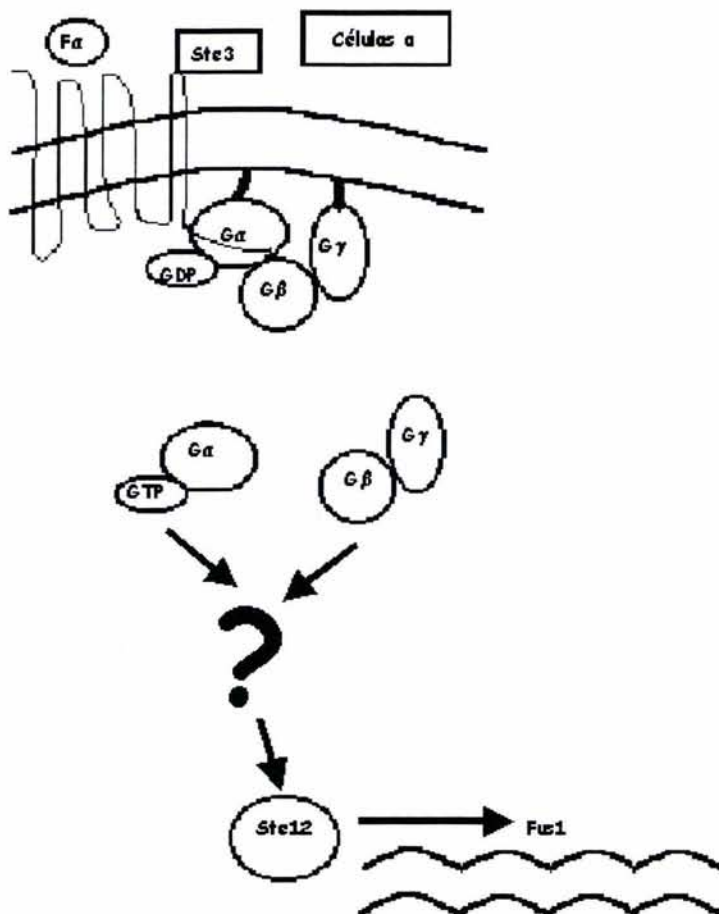


Figura 16. Esquema de la cascada de señalización del sistema de respuesta a feromona de *K. lactis*, donde se muestra al receptor  $KISte3p$  y el papel que tiene en el sistema.

## 6. CONCLUSIONES

El marco abierto de lectura del gen *KISTE3* es de 1.3Kb, y codifica para una proteína con un peso molecular hipotético de 50kDa. La proteína se predice de siete dominios transmembranales acoplado a una proteína G heterotrimérica, con homología a ScSte3p.

El gen *KISTE3* está involucrado en el sistema de respuesta a feromona sexual y su interrupción en células *MATa* causa esterilidad, además de expresarse específicamente en las células *MATa*.

KISte3p se localiza en la membrana plasmática.

Su extremo carboxilo terminal se asocia a la subunidad  $KIGpa_1^{\alpha 1}$  de la proteína G heterotrimérica, pero no a la subunidad  $KISte4^{G\beta}$ , en contraste con el extremo carboxilo terminal de ScSte2p, el cual se asocia tanto a  $\alpha$  como a  $\beta$ .

## 7. PERSPECTIVAS

Ahora que tenemos identificado al receptor *KISte3p* es necesario caracterizarlo y saber si se comporta de forma similar a su homólogo *ScSte3p*, por eso se requiere profundizar en los siguientes aspectos:

Expresión heteróloga de *KISte3* y *ScSte3*.

Estudios de regulación por fosforilación.

Estudios de dimerización.

Estudios sobre la activación de la proteína G por unión de feromona a *KISte3*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dickinson, J.R. and Schweizer M. 1999. The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Taylor & Francis*. 1-22, 657-754.
- 2.- Dohlman, H.G. and Thorner, J.W. 2001. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem*. 70:703-54.
- 3.- Dohlman, H.G. 2002. G proteins and pheromone signaling. *Annu Rev Physiol*. 64:129-52.
- 4.- Fukuhara, H., Breunig, K.D. and Wésolowski-Louvel, M. 1996. *Kluyveromyces lactis* in Genetics, Biochemistry and Molecular Biology of Non-conventional Yeast. Ed. Springer Verlag. 80p.
- 5.- Brake, A., Irvine, B., Masiarz, F. and Shultz, K. 1988. Structure of genes encoding precursors of *Kluyveromyces lactis* transported proteins. *Yeast*. 4, S436.
- 6.- Michaelis, S. and Herskowitz, I. 1988. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol Cell Biol*. Mar;8(3):1309-18.
- 7.- Saviñon-Tejeda, A.L., Ongay-Larios, L., Valdes-Rodriguez, J. and Coria, R. 2001. The *KIGpa1* gene encodes a G-protein alpha subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol*. 183(1), 229-34.
- 8.- Lloret, A., Savinon-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Tenorio, E.P. and Coria, R. 2003. The KIFUS1 gene is required for proper haploid mating and its expression is enhanced by the active form of the Galpha (Gpa1) subunit involved in the pheromone response pathway of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Feb 14;219(1):105-13.
- 9.- Haber, J.E. 1998. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet*. 32, 561-99.
- 10.- Astrom, S.U., Kegel, A., Sjostrand, J.O. and Rine, J. 2000. *Kluyveromyces lactis* Sir2p regulates cation sensitivity and maintains a specialized chromatin structure at the cryptic alpha-locus. *Genetics*. Sep;156(1):81-91.
- 11.- Sprague Jr., G.F. and Thorner, J.W. 1992. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene Expression. Chapter 12: Pheromone Response and Signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 657-744
- 12.- Feng, Y. and Davis, N.G. 2000, Feedback Phosphorylation of the Yeast a-Factor Receptor Requires Activation of the Downstream Signaling Pathway from G Protein through Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular And Cellular Biology*. Vol. 20, No. 2, 563-574.
- 13.- Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. 2002. Seven-Transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol 3, 639-650.

- 14.- Ongay-Larios, L., Saviñón-Tejeda, A.L., Williamson, Jr. M.J., Durán-Avelar, M.J. and Coria, R. 2000. The Lau-132 of ste4(Gb) subunit is essential for proper coupling of the g protein with the ScSte2p a factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Letters*. 467, 22-6.
- 15.- Chen, L. and Davis, N.G. 2000. Recycling of the Yeast a-Factor Receptor. *The Journal of Cell Biology*. 151 (3), 731-738.
- 16.- Chen, L. and Davis, N.G. 2002. Ubiquitin-Independent Entry into the Yeast Recycling Pathway. *Traffic*. 3, 110-123.
- 17.- Roth, A.F., and N.G. Davis. 1996. Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J. Cell Biol.* 134:661-674.
- 18.- Roth, A.F., D.M. Sullivan, and N.G. Davis. 1998. A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J. Cell Biol.* 142:949-961.
- 19.- Sambrook, J., Fritsch, E.T. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y. 1.116- 1.118 y 4.37-4.38.
- 20.- Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.D. 1995. PCR Primer. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*. 713p.
- 21.- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3), 443-5.
- 22.- Lench, K. and Brent, R. 1987. Miniprep of plasmid DNA. Current protocol in molecular biology. John Wiley & Sons. New York.
- 23.- Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166.
- 24.- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1996. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons. New York*. 13.12.
- 25.- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96, 23-28.
- 26.- Gietz, R.D. and Woods, R.A. 2001. Genetic Transformation of Yeast. *BioTechniques*. 30, 816-831.
- 27.- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associate with Cdk2. *Cell*. 75(4), 791-803.
- 28.- Guthrie, C. and Fink, G. R. 1991. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. Vol. 194, 303-318.



- 29.- Bolotin-Fukuhara, M., Toffano-Nioche, C., Artiguenave, F., Duchateau-Nguyen, G., Lemaire, M., Marmeisse, R., Montrocher, R., Robert, C., Termier, M., Wincker, P. and Wesolowski-Louvel, M. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11 *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.* 487 (1), 66-70.
- 30.- Sprague, G.F. Jr., Jensen, R. and Herskowitz, I. 1983. Control of yeast cell type by the mating type locus: positive regulation of the alpha-specific STE3 gene by the MAT alpha 1 product. *Cell.* 32(2):409-15.
- 31.- Saviñon-Tejeda, A.L., Ongay-Larios, L., Ramírez, J. and Coria, R. 1996. Isolation of a gene encoding a G protein alpha subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* 12, 1125-33.
- 32.-Miyajima, I., Nakafuku, M., Nakayama, N., Brenner, C., Miyajima, A., Kaibuchi, K., Arai, K., Kaziro, Y. and Matsumoto, K. 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, 1011-9.
- 33.- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P. and MacKay, V.L. 1989. The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell.* 56, 467-77.
- 34.- Chinault, S.L., Overton, M.C. and Blumer, K.J. 2004. Subunits of a yeast oligomeric G protein-coupled receptor are activated independently by agonist but function in concert to activate G protein heterotrimers. *JBC.* Publicación en prensa. Publicado en línea Febrero 5.
- 35.- Celic, A., Martin, N.P., Son, C.D., Becker, J.M., Naider, F. and Dumont, M.E. 2003. Sequences in the Intracellular Loops of the Yeast Pheromone Receptor Ste2p Required for G Protein Activation. *Biochemistry.* 42, 3004-3017.
- 36.- Kallal, L. and Kurjan, J. 1997. Analysis of the Receptor Binding Domain of Gpa1p, the G $\alpha$  Subunit Involved in the Yeast Pheromone Response Pathway. *Molecular And Cellular Biology*, Vol. 17, No. 5 p. 2897-2907.
- 37.- Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Hunt, J.F., Adair, B.D., Bormann, B.J., Dempsey, C.E. and Engelman, D.M. 1992. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *J. Biol. Chem.* Vol. 267, 7683-7689. *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, Issue 11, 7683-7689.
- 38.- Overton, M.C., Chinault, S.L. and Blumer, K.J. Oligomerization, Biogenesis, and Signaling Is Promoted by a Glycophorin A-like Dimerization Motif in Transmembrane Domain 1 of a Yeast G Protein-coupled Receptor. 2003. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, 49369-49377.