

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología

**“La vía de respuesta a feromonas de apareamiento de la levadura *Kluyveromyces lactis*, no requiere de la subunidad G $\gamma$  (KlSte18p) para la activación del sistema”.**

## Tesis

Que para obtener el Título de:

**BIÓLOGA**

Presenta:

Rocío del Carmen Navarro Olmos

Director de Tesis:

Dr. Roberto Coria Ortega.

2006



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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno.  
Navarro  
Olmos  
Rocío del Carmen  
56732588  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de ciencias  
Biología
2. Datos del tutor.  
Doctor  
Roberto  
Coria  
Ortega
3. Datos del Sinodal 1.  
Doctora  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe
4. Datos del Sinodal 2.  
Doctora  
América Nitxin  
Castañeda  
Sortibrán
5. Datos del Sinodal 3.  
Doctora  
Marina  
Macías  
Silva
6. Datos del Sinodal 4.  
Ingeniero Bioquímico  
Héctor  
Quezada  
Pablo
7. Datos del trabajo escrito.  
“La vía de respuesta a feromonas de apareamiento de la levadura *Kluyveromyces lactis*, no requiere de la subunidad G $\gamma$  (KlSte18p) para la activación del sistema”.  
50 páginas  
2006

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de las siguientes subvenciones:

DGAPA-PAPIIT IN-209602 y CONACyT 44178

A mis abuelas  
Tere Caro Martignon † y Elvi Varas de V.  
Por ser ejemplo de fortaleza y tenacidad  
y por ser pilares de sus familias,  
aún en la vejez.

## Agradecimientos

Gracias al Doctor Roberto Coria por su paciencia, sus enseñanzas, por introducirme a la investigación y por darme un lugar en su laboratorio.

Gracias a mis sinodales Dr. Marina Macías Silva, Dra. América Castañeda Sortibrán, I.B.Q. Héctor Quezada Pablo, y la Dra. Laura Kawasaki Watanabe, por sus observaciones y sugerencias.

A mi Familia.

Gracias a mis padres, Carlos y Carmen, porque sin ustedes no habría podido realizar éste trabajo. Gracias a mis hermanos por el tiempo compartido, por su apoyo y comprensión. Gracias Brock por tus consejos y las pláticas nocturnas interminables. Gracias Fana por inducirme a leer, a investigar y a encontrar.

Al laboratorio 302 ote.

Gracias a Laurita Kawasaki por su ayuda, su asesoría y su ilimitada paciencia, por su orden y su alegría.

Gracias Miriam por ser mi compañera desde el principio de este trabajo, por tu confianza, por escucharme, por asesorarme, por brindarme tu amistad y por aguantar mis locuras. Gracias Paco por tus consejos, por tu ayuda, y por tu estilo particular de alegrarme el día. Gracias Edithe y Nancy por sus consejos, por su tiempo, por su agradable compañía, y por los reves, claro. Gracias María, Emmanuel y Rodrigo por hacer a este laboratorio más ameno. Gracias Mary, por que sin ti, esta tesis simplemente no hubiera salido bien.

Gracias a la doctora Laura Ongay por sus consejos muy valiosos y que no siempre estan relacionados con mi tesis, por preocuparse y por su amistad. Gracias a Mine y a Lupita, por su ayuda y claro por las secuencias y los oligos, que se han vuelto indispensables.

Gracias Gerarado Coello, por tus pláticas, por tus consejos, por tus críticas, por tus chistes y por amenizarnos cada tarde en el lab.

A la UBM.

Gracias por el apoyo técnico de la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A mis amigos.

Gracias a mis amigas: Hana, Chabela, Silvia y Winnie, por aguantar mi terrible carácter desde hace casi 18 años, y por siempre estar disponibles cuando las necesito.

Gracias a Agustina, a Miriam N., a Bassols, a Liz, porque mi estancia en Ciencias se volvió increíble gracias a ustedes. A las niñas Nayelli y Vanesa por su apoyo y su buen humor.

Gracias a los matemáticos: Mariano, el Gabar, Wassa, Davo, Charo, por que llenaron mi cabeza de ideas nuevas y por darle un giro diferente a mi vida. Gracias a las novias de los matemáticos (por supuesto) Rebe y Male, por rescatarme y escucharme cuando más lo necesité.

Gracias a Hugo, Memo, Cristian, Rodrigo, Sergio, y Manuel, el billar se volvió la mejor terapia de relajación y sin ustedes el piso sería muy aburrido.

# Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Las Levaduras.....	2
1.1.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	3
1.2. Ciclo de Vida de las Levaduras.....	5
1.3. Transducción de Señales y Proteínas G.....	7
1.4. La Subunidad G $\gamma$ .....	10
2. Justificación.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1. Objetivo General.....	15
3.2. Objetivos Particulares.....	15
4. Materiales y Métodos.....	16
4.1. Diagrama de Flujo de la Metodología.....	16
4.2. Cepas.....	16
4.3. Medios de Cultivo.....	17
4.4. Plásmidos.....	18
4.4.1. Plásmidos Empleados para Clonación e Interrupción de Genes.....	18
4.4.2. Plásmidos Empleados para el Ensayo de Doble Híbrido.....	18
4.5. Técnicas de DNA Recombinante.....	19
4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
4.7. Hibridaciones Moleculares.....	20
4.8. Ensayo de Doble Híbrido.....	21
4.8.1. Características del Ensayo.....	21
4.8.2. Análisis Cualitativo.....	24
4.8.3. Análisis Cuantitativo.....	24
4.9. Extracción y Purificación de Plásmidos de <i>E. coli</i> .....	25
4.10. Extracción de DNA de Levaduras.....	25
4.11. Extracción de RNA de Levaduras.....	25

4.12. Transformaciones en Levaduras.....	25
4.13. Ensayos de Apareamiento.....	25
5. Resultados.....	26
5.1. Clonación del Gen <i>KISTE18</i> y Análisis de la Secuencia.....	26
5.2. Mutante $\Delta Kiste18$ y su Efecto en el Apareamiento.....	27
5.2.1. Construcción de la Mutante $\Delta Kiste18$ .....	27
5.2.2. Estructura del Alelo Mutante.....	28
5.2.3. Caracterización Fenotípica de la Mutante $\Delta Kiste18$ ....	29
5.2.4. Comprobación de la Expresión del Gen.....	31
5.3. Interacción entre la Subunidad $G\beta$ y la Subunidad $G\gamma$ .....	33
5.3.1. Análisis Cualitativo de las Colonias con Proteínas Interactuantes.....	33
5.3.2. Análisis Cuantitativo de la Actividad de la $\beta$ -galactosidasa.....	34
5.4. Expresión del Gen Mutante <i>KIste18<sup>ser87</sup></i> .....	36
5.4.1. Construcción del Gen Mutante <i>KIste18<sup>ser87</sup></i> .....	36
5.4.2. Efecto de la Expresión de <i>KIste18<sup>ser87</sup></i> en <i>K. lactis</i> .....	37
5.4.3. Efecto de la Expresión de <i>KIste18<sup>ser87</sup></i> en <i>S. cerevisiae</i> .....	38
6. Discusión.....	40
7. Conclusiones.....	44
8. Perspectivas.....	45
9. Apéndice.....	46
10. Bibliografía.....	47

## Resumen.

Las proteínas G heterotriméricas están involucradas en numerosas vías de respuesta a diversas señales como luz, hormonas, etc. La vía de respuesta a feromonas de apareamiento mediada por proteínas G ha sido ampliamente estudiada y descrita en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*. En *Kluyveromyces lactis* ésta vía de respuesta es diferente en algunos aspectos.

El objetivo inicial de este trabajo fue determinar la participación de la subunidad  $G\gamma$  en *K. lactis*, por medio de ensayos de apareamiento hechos con mutantes *null*, observamos que ésta subunidad no es esencial en el sistema de respuesta a feromonas. Ya que no hay reportes de que la subunidad  $G\beta$  tenga actividad como monómero, realizamos ensayos de interacción proteína-proteína *in vivo* con el sistema genético del doble híbrido, para saber si la subunidad  $G\gamma$  se asocia a la subunidad  $G\beta$  para formar un dímero. Los resultados de estos ensayos nos indican que hay una fuerte interacción entre ambas subunidades.

Se sabe que la subunidad  $G\gamma$  en *S. cerevisiae* sufre modificaciones lipídicas post-traduccionales que le permiten anclarse a la membrana, conociendo estos datos, decidimos hacer una mutante de la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* deficiente en su farnesilación, para comprobar si ésta es también una función importante. Encontramos que las mutantes *Klste18<sup>ser87</sup>* seguían apareándose de forma normal, lo que confirma que la subunidad  $G\gamma$  no es esencial en el sistema, aun cuando es posible que se encuentre formando parte del dímero  $G\beta\gamma$  y por consiguiente participe en la transmisión la señal de la feromona.

# 1. Introducción.

## 1.1. Las Levaduras.

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares que agrupan a una gran variedad de especies, incluyendo tanto especies patógenas, como especies inocuas y de gran utilidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, característica que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Esta característica fue estudiada ampliamente y permitió el descubrimiento y análisis de muchos pasos que intervienen en el proceso de fermentación alcohólica, gracias a esto, se continuó con el estudio de esta levadura. Además de poder fermentar, *S. cerevisiae* posee una serie de propiedades que han permitido utilizarla como modelo biológico en la investigación: una de las características más importantes es que las levaduras son eucariontes que poseen un genoma relativamente pequeño que facilita su análisis y manipulación; poseen además, una fase sexual dentro de su ciclo de vida, lo que permite abordar estudios de genética formal; y se obtienen con gran facilidad, en grandes cantidades (Campell y Duffus, 1988; Dickinson y Schweizer, 2004).

El avance y descubrimiento de técnicas moleculares tales como el uso de las enzimas de restricción, la perfección de los métodos para transformar levaduras, el uso de técnicas de clonación y el aislamiento específico de genes, llevaron al desarrollo de métodos para analizar el DNA y las proteínas de las levaduras, como el sistema genético de doble híbrido que permite la identificación de proteínas interactuantes y el desarrollo de los cromosomas artificiales de levadura o YAC's, que han sido de gran ayuda para secuenciar genomas eucariontes. Las levaduras también han jugado un papel importante en el desarrollo de los sistemas de expresión de proteínas de otros eucariontes que a diferencia de lo que ocurre en las bacterias como *Escherichia coli*, en éstas es posible que se lleven a cabo

modificaciones post-traduccionales como la farnesilación, la miristilación, la acetilación, y el procesamiento proteolítico, indispensables para que la proteína posea actividad biológica. El uso de las levaduras ha sido muy exitoso incluso para la expresión de proteínas humanas, como la renina y la primera vacuna humana obtenida por técnicas de DNA recombinante (Campell y Duffus, 1988; Dickinson y Schweizer, 2004).

### **1.1.1. *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt (1971).**

Al igual que *S. cerevisiae*, *K. lactis* pertenece al grupo de los hemiascomycetes y es una levadura gemante. Ha sido estudiada desde 1960 y se le ha encontrado en hábitats muy diversos, pero la mayoría de las cepas han sido aisladas a partir de productos derivados de la leche, en donde la fuente de carbono más abundante es la lactosa (Spencer *et al.*, 1983).

Esta levadura tiene seis cromosomas, que miden de 1 a 3 Mb, y el tamaño total del genoma es de ~10 Mb. El DNA mitocondrial es una molécula circular de 39 Kb. Muchas cepas contienen un par de plásmidos de DNA lineares: pGKL1 (8.8 Kb) y pGKL2 (13.4 Kb) que le confieren el fenotipo “killer”, la toxina “killer” es una toxina letal para algunas cepas sensibles de la misma especie (Souciet *et al.*, 2005, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>).

El interés en *K. lactis* se debe en parte a sus características fisiológicas distintivas del resto de las levaduras, ya que aunque es capaz de asimilar una gran variedad de fuentes de carbono, es característica su capacidad de crecer en lactosa como única fuente de carbono (Schaffrath y Breuning, 2000; Spencer *et al.*, 1983). A diferencia de *S. cerevisiae*, *K. lactis* es una levadura “petite-negativa”. El fenotipo “petite” se refiere a la morfología claramente más pequeñas que adquieren las levaduras que pueden crecer en medios fermentables cuando la respiración ha sido bloqueada. Las levaduras “petite-negativas” no pueden crecer en medios fermentables, son aerobias estrictas, por lo que una mutación que las inhabilite para respirar es letal (Spencer *et al.*, 1983).

Otra diferencia importante entre estas dos levaduras, es que *K. lactis* se encuentra predominantemente en haplofase, esto es que cuando se forman células diploides,

éstas entran espontáneamente a meiosis y esporulan, por lo que es común encontrar a *K. lactis* en estado haploide a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Schaffrath y Breuning, 2000; Spencer *et al.*, 1983).

La elaboración de un vector replicativo, basado en el plásmido pKD1 (Chen *et al.*, 1988), ha contribuido al desarrollo de la genética molecular de esta levadura. Además de que se ha vuelto un organismo modelo para estudiar aspectos fisiológicos en levaduras no convencionales. *K. lactis* ha sido utilizada por muchos años como una fuente de  $\beta$ -galactosidasa y recientemente ha sido utilizada exitosamente para la producción a gran escala de proteínas heterólogas como la proquimosina de vaca, la interleucina-1 $\gamma$  humana y la albúmina humana (Schaffrath y Breuning, 2000).

## 1.2. Ciclo de Vida de las Levaduras.

El ciclo de vida de las levaduras está representado por una fase asexual o vegetativa, y una fase sexual.

Ciclo de vida vegetativo.

Durante la fase vegetativa, las levaduras se dividen por gemación, la célula hija inicia su crecimiento formando una yema a partir de la célula madre. Posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. En este tipo de división no hay intercambio genético entre las células (Kocková-Kratochvílová, 1990; Jones *et al.*, 1992; Dickinson y Schweizer, 2004; Nasim *et al.*, 1989).

Ciclo de vida sexual.

Consiste básicamente en dos procesos: conjugación y esporulación. La conjugación es un proceso en el que se fusionan dos células haploides de sexos opuestos. Es un proceso inducido por factores sexuales secretados por las células, estos factores son conocidos como feromonas de apareamiento. El tipo de feromona producida depende del tipo celular, es decir, las células haploides tipo **a** secretarán feromona-**a**, y las células tipo  $\alpha$  feromona- $\alpha$ . Estas feromonas son reconocidas por receptores transmembranales específicos acoplados a proteínas G heterotriméricas, que activan una cascada de señales que finalizan con la inducción de la transcripción de genes que a su vez conducirán a la formación de un gameto. Como resultado de la conjugación, se forman células diploides que bajo condiciones específicas sufren división meiótica y producen ascosporas con cuatro esporas cada una, dos esporas tipo **a**, y dos tipo  $\alpha$ . Éstas son liberadas al medio (esporulación) y germinan para dar lugar a células haploides nuevamente y reiniciar el ciclo (Kocková-Kratochvílová, 1990; Jones *et al.*, 1992; Dickinson y Schweizer, 2004; Nasim *et al.*, 1989) (Fig. 1).

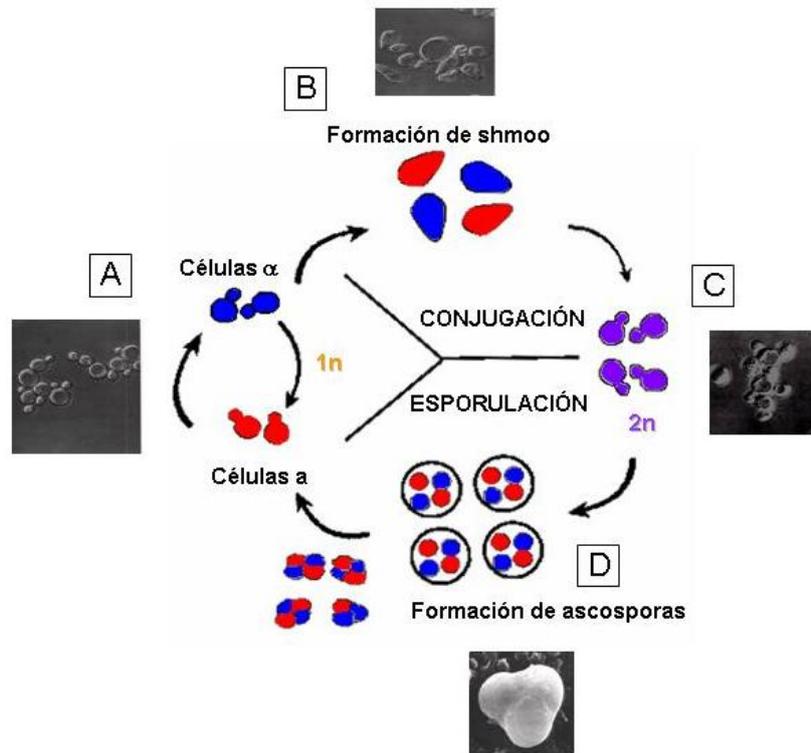


Figura 1. Esquema del ciclo sexual de la levadura *S. cerevisiae*. A) Las células haploides secretan feromonas al medio y reconocen a las células del sexo opuesto. B) Las feromonas activan una cascada de señalización mediada por proteínas G, que llevan a la transcripción de genes involucrados en el apareamiento, las células adquieren una morfología en forma de pera conocida como "shmoo". C) Después de la conjugación se forman células diploides. D) Las células diploides forman ascosporas, que esporularán y germinarán para formar células haploides, y así reiniciar el ciclo.

### 1.3. Transducción de Señales y Proteínas G.

La transducción de señales es un proceso de comunicación celular. Los sistemas de señalización mejor caracterizados son aquellos que involucran receptores transmembranales acoplados a proteínas G y que activan uno o varios efectores. En humanos los receptores acoplados a proteínas G intervienen en las respuestas a luz, olores, sabores, hormonas, neurotransmisores, etc. En los eucariontes más simples, son los encargados de mediar señales que afectan procesos básicos como la división celular, el apareamiento y la morfogénesis (Dohlman, 2002).

En las levaduras hay dos tipos celulares haploides ( $MAT\alpha$  y  $MATa$ ), como se mencionó anteriormente, que secretan al medio feromonas peptídicas que estimulan a la célula del sexo opuesto. La transducción de señales comienza cuando el factor- $\alpha$  (o feromona- $\alpha$ ) se une a su receptor específico, que en *S. cerevisiae* es Ste2p, en las células del sexo  $MATa$ , mientras que el factor- $a$  (o feromona- $a$ ) se une al receptor Ste3p en las células del sexo  $MAT\alpha$ . Estos receptores de siete dominios transmembranales activan a la proteína G heterotrimérica que está compuesta por la subunidad  $G\alpha$  (Gpa1p o Scg1p) y el dímero  $G\beta\gamma$  (Ste4p/Ste18p) (Fig. 2). La proteína G se encuentra anclada a la membrana por modificaciones lipídicas del extremo amino terminal de la subunidad  $G\alpha$  y en el extremo carboxilo terminal de la subunidad  $G\gamma$ . La proteína G se encuentra asociada a su receptor específico por sitios de contacto con las tres subunidades, pero en particular con el extremo carboxilo-terminal de la subunidad  $G\alpha$  (Hamm, 1998). Cuando el receptor es activado por la feromona, éste induce cambios conformacionales en la subunidad  $G\alpha$  lo que induce el intercambio de GDP por GTP en esta subunidad, disociándose del dímero  $G\beta\gamma$ . De esta forma el dímero  $G\beta\gamma$  queda libre para activar a sus efectores río abajo y la señal se transmite y se amplifica a través de un módulo de MAP cinasas (Fig. 2). Después de la activación de esta cascada de proteínas, sigue la activación y fosforilación de Ste12p que es un factor de transcripción de los genes necesarios para la fusión de células haploides y la continuación del ciclo celular. La señal persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP, y las subunidades de la proteína G se reasocian completando el ciclo de activación (Dohlman, 2002; Hamm, 1998; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Whiteway *et al.*, 1989; Dickinson y Schweizer, 2004).

En *S. cerevisiae*, los efectores del dímero  $G\beta\gamma$  son: Cdc24p que es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de Cdc42p que es una proteína pertenece a la superfamilia de GTPasas pequeñas de tipo Ras, las cuales intervienen en los rearrreglos de actina promoviendo el crecimiento polarizado de la célula y la morfogénesis. Otro de los efectores es Ste20p que pertenece a la familia PAK (proteínas-cinasas activadas por p-21). El papel de esta proteína no es claro pero una mutante *ste20* es parcialmente estéril. El tercer efector es Ste5p que es una proteína de andamiaje para las proteínas cinasas: Ste11p<sup>MAPKKK</sup>, Ste7p<sup>MAPKK</sup> y Fus3p<sup>MAPK</sup> (Fig. 2). Este último efector promueve la interacción entre las MAP cinasas, haciendo más eficiente la señalización. Una mutante *ste5* tiene una notable deficiencia de apareamiento. Aunque todos estos efectores se unen a  $G\beta$ , una mutante *ste18* ( $G\gamma$ ) es incapaz de responder a la feromona de apareamiento y es estéril, lo que indica que se requiere el dímero para activarlos (Whiteway y Thomas, 1994; Ford *et al.*, 1998). También se ha observado que Gpa1p tiene un papel negativo en el sistema de respuesta a feromonas, ya que una interrupción de este gen, provoca el bloqueo del ciclo celular en la fase G1 y promueve el apareamiento (Dohlman, 2002).

En *K. lactis* nuestro grupo ha encontrado que, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, tanto la subunidad  $G\alpha$  (Saviñon-Tejeda *et al.*, 2001) como la subunidad  $G\beta$  (Kawasaki *et al.*, 2005) son esenciales para transducir el estímulo de la feromona y promover el apareamiento, ya que las mutantes  $\Delta Klgpa1$  y  $\Delta Klste4$ , independientes, tienen fenotipo de esterilidad.

Proteína	Función
Ste2p/Ste3p	Receptores acoplados a proteínas G
Gpa1p	Subunidad G $\alpha$ de la proteína G
Ste4p	Subunidad G $\beta$ de la proteína G
Ste18p	Subunidad G $\gamma$ de la proteína G
Ste20p	PAK
Ste50p	Proteína cinasa
Ste5p	Proteína de andamiaje
Ste11p	MAPKKK
Ste7p	MAPKK
Fus3p/Kss1p	MAPK
Cdc42p	GTPasa pequeña tipo Ras
Cdc24p	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF)
Ste12p	Factor de transcripción

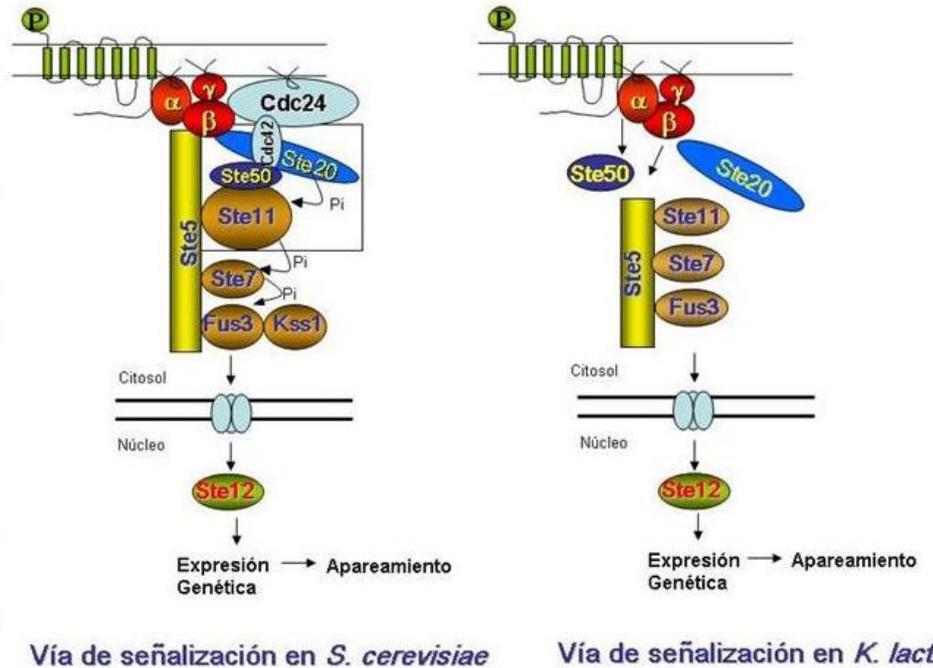


Figura 2. Esquema de las vías de señalización en respuesta a feromonas de apareamiento de las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

En el laboratorio, se han clonado los genes que codifican para varios de los componentes de la vía de transducción de señales en respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*, entre ellos se han clonado los receptores a feromonas, K1Ste3p y K1Ste2p, que conservan alrededor del 50% de identidad con sus homólogos de *S. cerevisiae*. K1Ste3p es el receptor a feromona- $\alpha$ , mientras que K1Ste2p es el receptor a feromona- $\alpha$  una mutante, las mutantes  $\Delta K1ste3$  y  $\Delta K1ste2$  son estériles. También se ha clonado el gen que codifica para la proteína K1Ste20p, que presenta regiones de unión a G $\beta$  altamente conservadas en el extremo carboxilo-terminal, la interrupción de éste gen también tiene un fenotipo de esterilidad. Con respecto al modulo de MAP cinasas, se han clonado: K1Ste11p<sup>MAPKKK</sup>, K1Ste7p<sup>MAPKK</sup> y K1Fus3p<sup>MAPK</sup>, y la proteína de andamiaje K1Ste5p, las interrupciones de los genes que codifican para éstas proteínas, también presentan un fenotipo de esterilidad. Se clonó también K1Ste50p que es el posible efector de G $\alpha$  y K1Ste12p que es un factor transcripcional, se observó que una mutante  $\Delta K1ste12$ , es estéril. Éstas proteínas siguen en estudio (Coria *et al.*, 2005; Lloret *et al.*, 2003) (Fig. 2).

## 1.4. La Subunidad $G\gamma$ .

La subunidad  $G\gamma$  de *S. cerevisiae* forma parte de la proteína G heterotrimérica, y está codificada por el gen *STE18* que junto con la subunidad  $G\beta$  (*STE4*) forman el dímero  $G\beta\gamma$ . Cuando la proteína G es activada, el dímero  $G\beta\gamma$  queda libre para activar los efectores río abajo. Una vez que la señal termina, el dímero se reasocia con la subunidad  $G\alpha$ , inactivando así el sistema ((Dohlman, 2002; Hamm, 1998; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Whiteway *et al.*, 1989; Dickinson *et al.*, 2004).

Las subunidades  $G\gamma$  se caracterizan por poseer una caja CAAX bien conservada en el extremo carboxilo-terminal. El nombre de la caja CAAX proviene de los aminoácidos por los que está formada: "C" se refiere a un residuo de cisteína, "A" a un residuo de aminoácido no polar alifático y "X" a cualquier residuo de aminoácido. Esta caja CAAX, es modificada con una prenilación post-traducciona que consiste en la adición covalente de un grupo hidrofóbico prenilo, que puede ser un grupo farnesilo de 15 átomos de carbono o un grupo geranilgeranilo de 20 átomos de carbono; ambos actúan como donadores de grupos prenilo. La prenilación es catalizada por prenil-transferasas (farnesil-transferasa o geranilgeranil-transferasa 1 y 2, según sea el caso) (Magee y Marshall, 1999) (Fig. 3). La farnesilación y la geranilgeranilación, que son dos tipos de prenilación, están determinadas por el último aminoácido de la caja CAAX, de modo que, cuando el último residuo de este motivo es metionina, alanina, serina, cisteína o glutámico se añade un grupo farnesilo, si el último residuo es leucina o fenilalanina, será geranilgeranilizado (Whiteway y Thomas, 1994; Grishin *et al.*, 1994; Chinault y Blumer, 2003). Después de la adición del grupo prenil por la unión tioéster al residuo de cisteína, los últimos tres aminoácidos de la región CAAX son liberados por una proteasa (Ma y Rando, 1992).

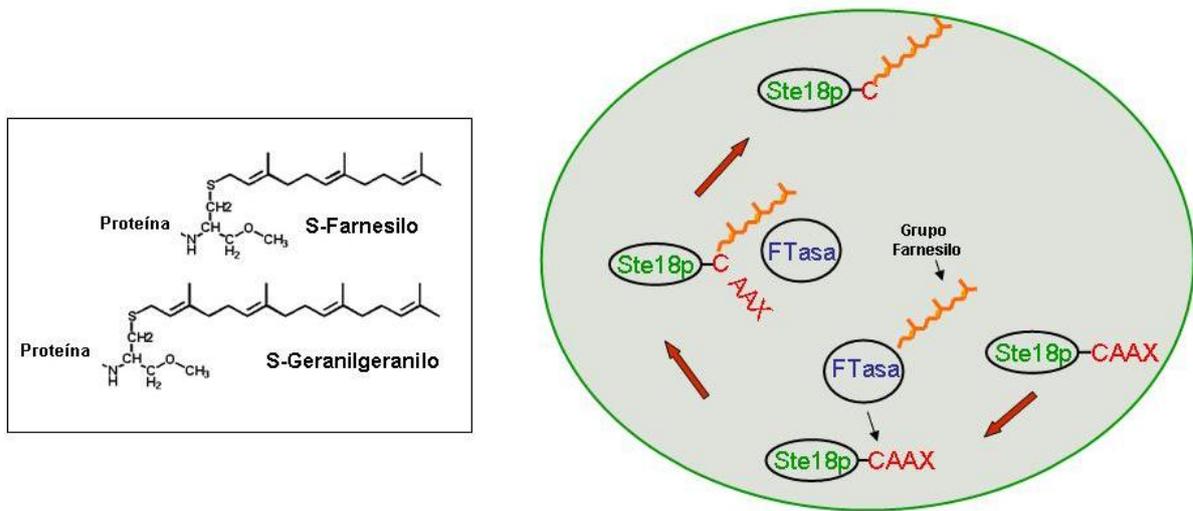


Figura 3. Esquema de la farnesilación de Ste18p. En el recuadro se indican las estructuras químicas del grupo farnesilo y del grupo geranilgeranilo, ambas son tipos diferentes de prenilación.

Las subunidades  $G\gamma$  de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*, presentan una metionina como último residuo del motivo CAAX, por lo que el tipo de prenilación que sufren, es la adición de un grupo farnesilo. Se ha reportado, que  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*, además de presentar una farnesilación en la cisteína 107, presenta también una palmitoilación en la cisteína 106. Una palmitoilación es la adición de un ácido graso saturado de 16 átomos de carbono a un residuo interno de cisteína por un puente tioéster. Una sustitución de la cisteína 107 presenta un fenotipo de esterilidad, mientras que una sustitución de la cisteína 106 es parcialmente estéril (Basu, 2004).

Estas modificaciones lipídicas, permiten a las proteínas que las sufren anclarse a la membrana citoplasmática. Ya que la subunidad  $G\gamma$  forma un dímero con la subunidad  $G\beta$ , la farnesilación permite que el dímero  $G\beta\gamma$  se ancle a la membrana, y permanezca en la vecindad del receptor y de la subunidad  $G\alpha$  para activar o inactivar a la proteína G (Fig. 4). Es por esto que una mutante que no puede ser prenilada, difícilmente activará la cascada de señalización ya que no se encuentra en la cercanía del receptor ni de la subunidad  $G\alpha$  (Hirschman y Jenness, 1999).

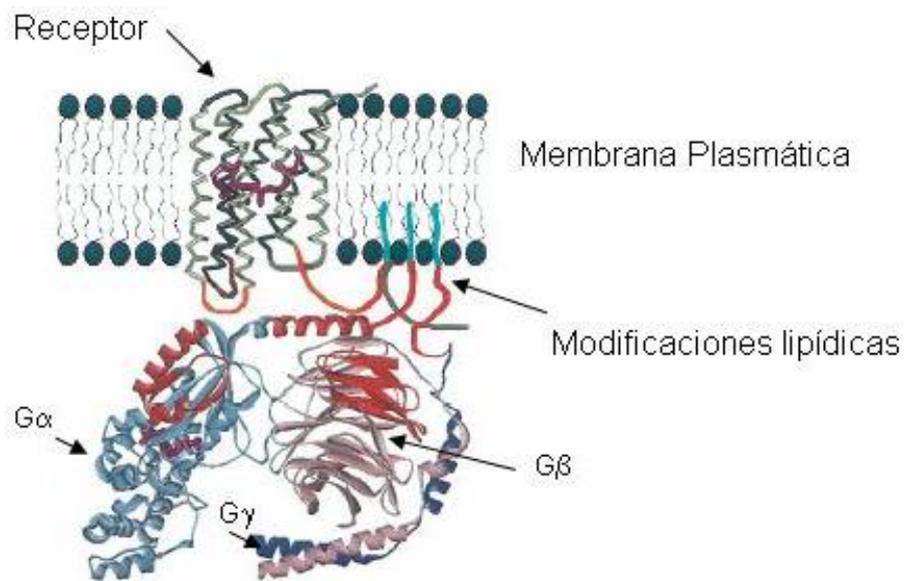


Figura 4. Interacción de la proteína G heterotrimérica con rodopsina (un tipo de fotorreceptor de mamíferos) y la membrana plasmática. Se pueden ver las modificaciones lipídicas de algunos elementos de la proteína G y la rodopsina: la palmitoilación del extremo carboxilo de la rodopsina,  $G\alpha$  es miristoilada y/o palmitoilada en el extremo amino, y  $G\gamma$  sufre una farnesilación. La subunidad  $G\alpha$  se indica en color azul claro, la subunidad  $G\beta$  en color rosa, y la subunidad  $G\gamma$  en azul marino (Hamm, 1998).

Además de ésta región CAAX altamente conservada, las subunidades  $G\gamma$  presentan regiones de interacción con la subunidad  $G\beta$  muy conservadas, ya que en todos los modelos de proteínas G que se conocen, las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , se asocian para formar un dímero (Hamm, 1998).

El heterodímero  $G\beta\gamma$  es una unidad estable. Todas las  $G\beta$  tienen un plegamiento característico, formando una estructura de propela, con 7 hojas  $\beta$ -plegadas. El extremo amino-terminal de  $G\beta$  se extiende como una estructura enrollada que se pliega sobre el extremo amino-terminal de la subunidad  $G\gamma$ , de forma que entra en contacto con las hojas 4 y 5, a esta estructura se le conoce como "coiled-coil" (Sondek *et al.*, 1996; Coria *et al.*, 1995) (Fig. 5).



Figura 5. Estructura del dímero  $G\beta\gamma$ . En color gris la subunidad  $G\beta$  y en color azul la subunidad  $G\gamma$ .  
(Sondek *et al.*, 1996).

## 2. Justificación

Las proteínas G están involucradas en una gran variedad de respuestas a diferentes estímulos. En células de mamíferos las proteínas G tienen múltiples papeles incluyendo la regulación de varias isoformas de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, canales de potasio, canales de calcio dependientes de voltaje y canales de sodio (Dowell *et al.*, 1998; Hamm, 1998). La subunidad  $G\alpha$  en mamíferos tiene un papel positivo en el sistema, ya que tiene efectores río abajo, en cambio en la levadura *S. cerevisiae* la subunidad  $G\alpha$  tiene un papel negativo en el sistema, ya que inhibe la actividad del dímero  $G\beta\gamma$ .

En *K. lactis*, tanto la subunidad  $G\alpha$  como la subunidad  $G\beta$  tienen un papel positivo, lo que hace interesante el estudio de las proteínas G en este organismo, ya que tiene más similitudes con la vía de mamíferos, que *S. cerevisiae*. El interés de éste trabajo es definir el papel de la subunidad  $G\gamma$  en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento de *K. lactis*, ya que en todos los sistemas estudiados es parte estructural del heterodímero.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo General.

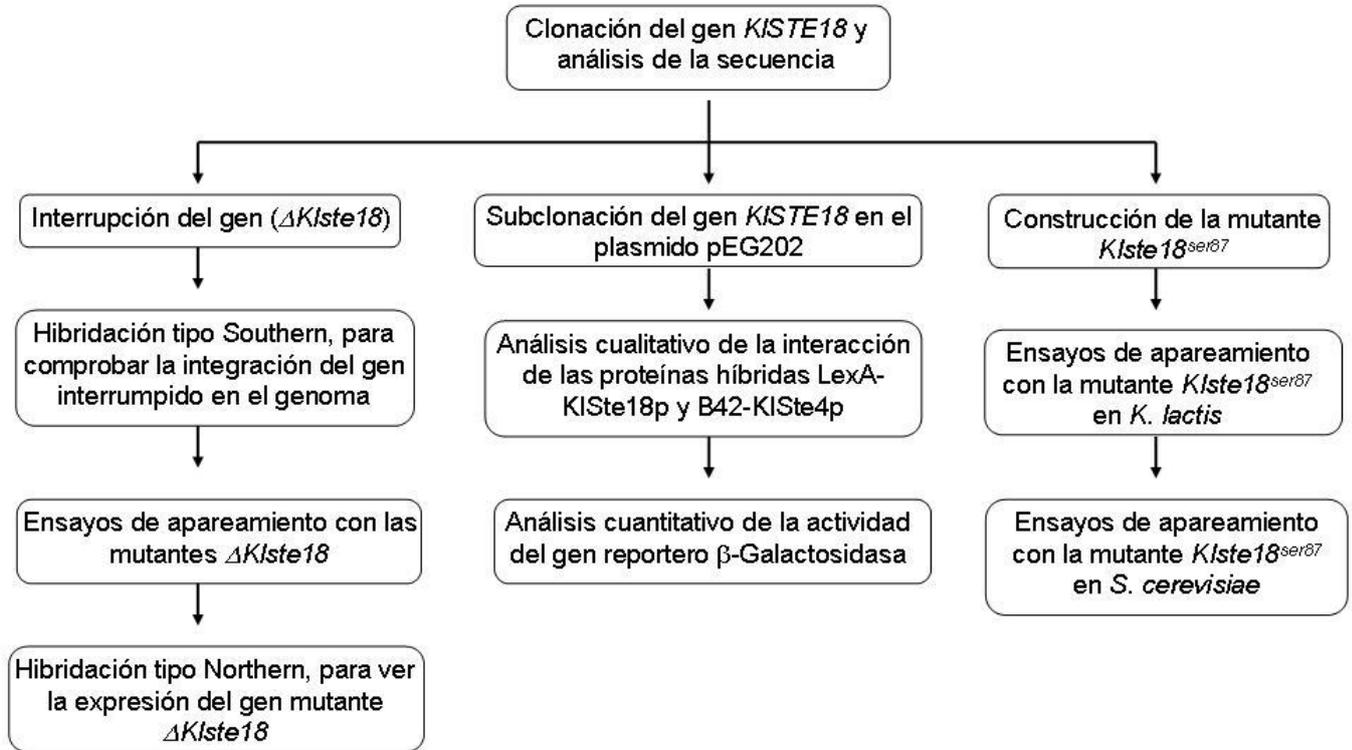
Conocer el papel de la subunidad  $G\gamma$  en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en la levadura *K. lactis*.

### 3.2 Objetivos Particulares.

- Por medio de ensayos de apareamiento determinar el fenotipo que produce una mutante  $\Delta K1ste18$ .
- Determinar si es posible la formación del dímero  $G\beta\gamma$  por medio de ensayos de interacción proteína-proteína con el sistema genético del doble híbrido.
- Identificar si la capacidad de la subunidad  $G\gamma$  para anclarse a la membrana por una modificación post-traducciona, es importante en el sistema de respuesta a feromonas en *K. lactis*.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Diagrama de Flujo de la Metodología.



### 4.2. Cepas.

- Bacterias.

*Escherichia coli*.

DH5 $\alpha$ . *supE44*  $\Delta lacU169(\phi 80 lacZ\Delta M15)$  *hsaR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Esta cepa se utilizó en todas las transformaciones bacterianas y propagaciones de plásmidos.

- Levaduras.

*Kluyveromyces lactis*.

155 (*MAT $\alpha$* ). *ade2, his3, ura3*.

12/8 (*MAT $\alpha$* ). *argA, lisA, ura3*.

*Saccharomyces cerevisiae*.

W303-1A (*MAT $\alpha$* ). *ade1, his3, leu2, trp1, ura3*.

Cepa 70. (*MAT $\alpha$* ). *met3, thr3*.

#### 4.3. Medios de Cultivo.

Nombre	Organismo	Características	Temperatura de incubación
LB	Bacterias	Medio que contiene triptona, cloruro de sodio y extracto de levadura.	37 °C
LB+antibióticos	Bacterias	Medio LB con el antibiótico indicado para la cepa inoculada.	37 °C
YPD	Levaduras	Medio completo que se utiliza para crecer levaduras.	30 °C
SD	Levaduras	Contiene mínimo sales, elementos traza, vitaminas, una fuente nitrogenada y glucosa.	30 °C
SD+aa	Levaduras	Medio mínimo SD al que se le agregan los aminoácidos indicados necesarios para el crecimiento de la cepa inoculada.	30 °C
SD-aa	Levaduras	Medio mínimo SD con aminoácidos esenciales, excepto los que se especifican.	30 °C
SGal	Levaduras	Medio mínimo similar al SD, pero contiene galactosa en lugar de glucosa.	30 °C

#### 4.4. Plásmidos.

##### 4.4.1. Plásmidos Empleados para Clonación e Interrupción de Genes.

Plásmido	Características
YEp352	Plásmido episomal, tiene el origen de replicación $2\mu$ para <i>S. cerevisiae</i> , el gen <i>URA3</i> como marcador de auxotrofia y un sitio de clonación múltiple.
YIp352	Plásmido de integración derivado de YEp352, posee el gen <i>URA3</i> , pero no tiene origen de replicación de levadura, tiene un sitio de clonación múltiple.
YEpKD352	Plásmido derivado del plásmido pUC18, al igual que YEp352, pero posee el origen de replicación <i>pKD1</i> de <i>K. drosophylarum</i> y el gen <i>URA3</i> .
pCR4-TOPO (®Invitrogen)	Plásmido diseñado para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR y amplificados con la enzima <i>Taq</i> polimerasa.

##### 4.4.2. Plásmidos Empleados para el Ensayo de Doble Híbrido.

Plásmido	Características
pEG202	Vector lanzadera, tiene el gen <i>LexA</i> (dominio de unión a DNA), un sitio múltiple de clonación. Además del origen de replicación <i>pBRori</i> para <i>E. coli</i> y el gen <i>AmpR</i> . Posee también el gen <i>HIS3</i> como marcador de selección y el origen de replicación $2\mu$ .
pJG4.5	Vector lanzadera, tiene el gen <i>B42</i> que es un activador de la transcripción. Tiene un sitio <i>EcoR1</i> y un sitio <i>Xho1</i> únicos para subclonar. Además del origen de replicación <i>pBRori</i> y el gen <i>AmpR</i> , tiene el gen <i>TRP1</i> como marcador de selección y el origen de replicación $2\mu$ .
pSH18-34	Vector lanzadera, tiene al gen <i>LacZ</i> , contiene el

	<p>promotor silvestre de <i>GAL1</i> cuyas secuencias río arriba fueron reemplazadas por operadores de <i>LexA</i>. Tiene el origen de replicación <i>pBRori</i>, y el gen <i>AmpR</i> ambos para <i>E.coli</i>, <i>URA3</i> como marcador de selección y el origen de replicación 2<math>\mu</math>.</p>
--	---

#### 4.5. Técnicas de DNA Recombinante.

Las técnicas de DNA recombinante empleadas se siguieron de acuerdo a Sambrook *et al.*, 1989; Lucotte y Barneyx, 1993.

#### 4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El gen *KISTE18* se amplificó por PCR a partir de DNA cromosómico extraído de *K. lactis*, los oligodesoxinucleótidos se diseñaron en base a la secuencia del gen consultada en la base de datos de Génolevures (Souciet *et al.*, 2005, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>), el fragmento obtenido se clonó en el plasmido pCR4-TOPO y se transformó en *E. coli* para almacenarlo. A partir de esa construcción, el ORF del gen se amplificó con los siguientes oligodesoxinucleótidos: 5'CCT TGG TGT AGT TTT3' (P1) de la posición -39 a -25 y 5'ATG TAA CTT AAT AAG3' (P2) de la posición +307 a +321 (Fig. 6). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 5 min.; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 52 °C por 30 seg. y 72 °C por 1 min.; y una elongación final de 5 min. a 72 °C.

La amplificación del gen *KISTE18* con los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* para su clonación en el plásmido pEG202, se hizo con los siguientes oligodesoxinucleótidos: 5'ATT TGT GTA CCA GAA TTC GGA GAG TTA CCA3' (P3) de la posición -15 a +15 y 5'ACG GCA GCA ATA TGT CGA CCA TCA CAT TAT GGT3' (P4) de la posición + 262 a +294 (Fig. 6). Las condiciones del PCR fueron: desnaturalización a 94 °C por 5 min.; 50 ciclos de 94 °C por 30 seg., 60 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; y una elongación final de 5 min. a 72 °C.



solución SSC 1X a 65 °C. la exposición de la membrana se hizo durante 4 horas y se scaneó utilizando el equipo Typhon.

#### **4.8. Ensayo de Doble Híbrido.**

##### **4.8.1. Características del Ensayo.**

El sistema genético del doble híbrido permite identificar una interacción proteína-proteína *in vivo* por la transcripción de un gen reportero, según el método de Fields y Song, 1989.

Para este ensayo se requieren tres tipos de plásmidos. El plásmido pEG202 posee una secuencia que codifica para los aminoácidos 1 a 202 del gen *LexA*, que codifica para un dominio de unión a DNA. Río abajo del gen *LexA* se encuentra un sitio de clonación múltiple, en donde se clonó el gen *KISTE18*. Esta proteína híbrida LexA-KISte18p se encuentra constitutivamente expresada, y se une a los operadores *LexA* que se encuentran río arriba del gen reportero *LacZ* pero no activa su transcripción (Fig. 7).

En el plásmido pJG4.5 se clonó el gen *KISTE4* en el sitio de clonación múltiple que se encuentra río abajo del gen *B42* que codifica para un dominio de activación de la transcripción. La proteína híbrida B42-KISte4p está condicionalmente expresada por el promotor GAL1, es decir, que se expresa cuando las células crecen en presencia de galactosa.

Se requiere además un gen reportero. En este trabajo se utilizó el plásmido pSH18-34 que contiene el gen reportero *LacZ*, cuyas secuencias río arriba se reemplazaron por los operadores LexA (Fig. 7).

Las proteínas híbridas B42-KISte4 que interactúen con las proteínas híbridas LexA-KISte18 activarán la transcripción del gen reportero *LacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Las células que posean estas proteínas interactuantes formarán colonias teñidas de color azul en medio que contenga galactosa y X-gal (Finley *et al.*, 1995; Fields y Song, 1989) (Fig. 7).

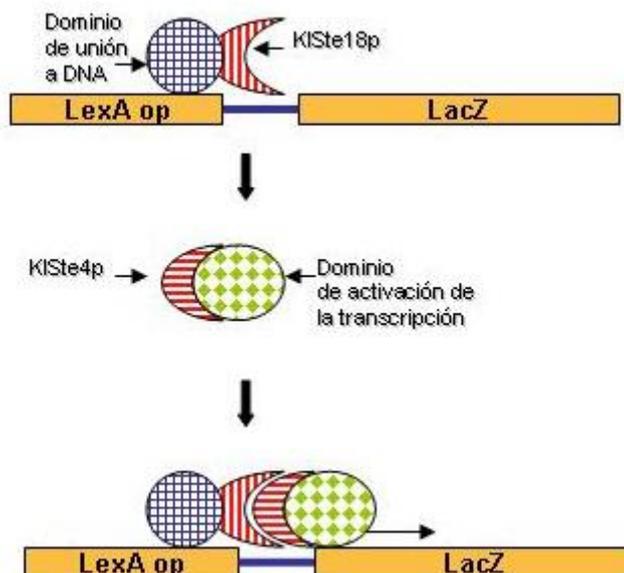


Figura 7. Sistema genético de doble híbrido. El esquema muestra la activación del gen reportero

LacZ, por la interacción de dos proteínas híbridas LexA-KISTe18p y B42-KISTe4p.

Para hacer la construcción pEG202-KISTE18, se introdujeron dos sitios de restricción en *KISTE18* por medio de PCR: un sitio *EcoRI* en el extremo amino-terminal, y un sitio *SalI* en el extremo carboxilo-terminal. El producto de PCR se digirió con estas mismas endonucleasas, y se clonó en el plásmido pEG202 (Fig. 8). El gen KISTE4 se clonó en el plásmido pJG4.5, en los sitios únicos de clonación *EcoRI* y *XhoI* (Fig. 8).

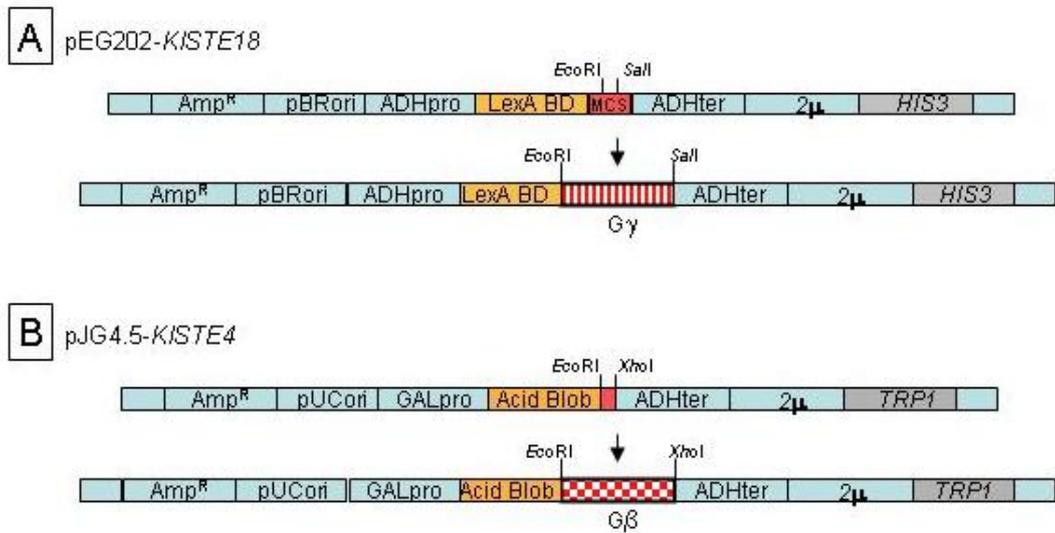


Figura 8. A) esquema de la construcción pEG202-*KISTE18*, la zona rayada representa el gen *KISTE18*, en amarillo el dominio de unión a DNA, MCS es el sitio de clonación múltiple. B) esquema de la construcción pJG4.5-*KISTE4*, la zona cuadrículada representa el gen *KISTE4*, en amarillo la zona en donde se encuentra el sitio de activación transcripcional. Para ambos esquemas los cuadros de color azul muestran la estructura del plásmido y en gris el marcador de auxotrofía.

La construcción pEG202-*KISTE18*, se transformó en la DH5 $\alpha$  de *E. coli*, se extrajo plásmido de cuatro colonias independientes y se hizo una digestión con las endonucleasa *EcoRI* y *SalI*, y posteriormente un gel de electroforesis para verificar la ligación del gen en el plásmido (Fig. 9).

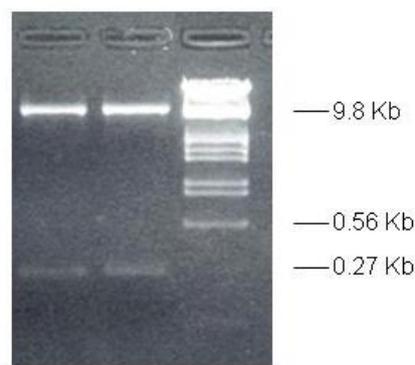


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de las construcciones pEG202-*KISTE18*. La digestión se hizo con las endonucleasa *EcoRI* y *SalI* a 37 °C por 1 h. Se espera una banda de 0.27 Kb de *KISTE18* y una banda de 9.58 Kb del vector pEG202.

Como control positivo se utilizaron las construcciones pEG202-*KIGPA1* y pJG4.5-*KISTE4*, como control negativo la construcción pJG4.5-Endoch, descritas en Ongay-Larios L. *et al.*, 2000.

Se transformó la cepa W303-1A con un plásmido de cada tipo, las células se crecieron en medio selectivo (SD-ura-his-trp) por 48 h. a 30 °C.

#### **4.8.2. Análisis Cualitativo.**

Una vez seleccionadas las colonias que poseen los tres plásmidos, se hizo un análisis cualitativo. Las colonias se crecen en medio SGal+ade+leu pH7 con X-gal al 2% a 30 °C durante 48 h.

El X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosido) es un compuesto sintético del tipo de los  $\beta$ -galactósidos, que cuando es hidrolizado, forma un producto de color azul en las células que tienen actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

#### **4.8.3. Análisis Cuantitativo.**

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa puede ser medida empleando sustratos que al ser hidrolizados producen compuestos coloreados. Para este ensayo se utiliza ONPG (*o*-nitrophenil- $\beta$ -D-Galactosido) que es un compuesto incoloro, pero cuando es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa produce galactosa y *o*-nitrophenol, éste último tiene una coloración amarilla que puede cuantificarse a 420 nm. Si la concentración de ONPG es suficiente, entonces la cantidad de *o*-nitrophenol producido es proporcional a la concentración de enzima presente (Miller, 1992).

Se hizo un cultivo de 10 ml con medio mínimo (SD+ade+leu) para cada muestra, se incubaron a 30 °C en agitación durante toda la noche. Para realizar el ensayo se siguió el protocolo descrito en Miller, 1992. Para la cuantificación de proteínas se hizo una curva de albúmina y se empleó el método de Bradford.

#### **4.9. Extracción y Purificación de Plásmidos de *E. coli*.**

Se siguió el procedimiento para miniprep QIAprep de QIAGEN que se basa en la lisis alcalina de las células. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

#### **4.10. Extracción de DNA de Levaduras.**

La extracción de DNA genómico se hizo siguiendo la técnica descrita por Hoffman y Winston, 1987.

#### **4.11. Extracción de RNA de Levaduras.**

Para extraer RNA de levaduras se siguió el protocolo de extracción con fenol caliente (Ausubel *et al.*, 1996).

#### **4.12. Transformaciones en Levaduras.**

Aunque existen varios métodos para transformar levaduras, en este trabajo se utilizó Acetato de Litio y PEG (polietilenglicol), siguiendo el método descrito por Adams *et al.*, 1997. Las células transformadas se plaquearon en medio selectivo (SD-ura) y se crecieron a 30 °C por 48 h.

#### **4.13. Ensayos de Apareamiento.**

El objetivo de estos ensayos es aparear células haploides de sexos contrarios para evaluar la eficiencia del apareamiento, mediante la obtención de células diploides. Es necesario que las células haploides mutantes se complementen genéticamente con las cepas silvestres.

El ensayo se realiza sembrando parches las células haploides mutantes en medio selectivo SD, mientras que las silvestres se plaquean en medio rico YPD para obtener un césped homogéneo de células. Después de dejarlas crecer a 30 °C por 24 h., se aparean por replicación en terciopelo en medio YPD y se dejan crecer por 24 h. más a 30 °C. Finalmente se replican en medio mínimo SD y se incuban a 30 °C por 48 h.

## 5. Resultados.

### 5.1. Clonación del Gen *KISTE18* y Análisis de la Secuencia.

La subunidad  $G\gamma$  en *K. lactis*, codificada por el gen *KISTE18*, es una pequeña proteína de 90 aminoácidos (Fig. 10). Este gen se clonó por medio de técnicas de PCR (ver materiales y métodos). El producto amplificado fue de 1.488 Kb. Los oligodesoxinucleótidos que se utilizaron, se diseñaron de acuerdo a las regiones que delimitan al gen completo.

La clona que se obtuvo tiene una región río arriba del ORF de 598 pb en la que probablemente se encuentra la región regulatoria. El polipéptido predicho conserva un 53% de identidad con la subunidad  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*.

```

ScSte18p MTSVQNSPRLQQPQEQQQQQQQLSLKIKQLKLRINELNKLKELSRERITASNA
KlSte18p .....MGELFYKIQLKLRRIEELNKLRLNELARERMTASNA
ScSte18p CLTIINYTSNTKDYTLPELWGYPVAGSNRFIEGLKNAQKNSQMSNSNSVCTIM (109)
KlSte18p CLSIIDYTSHTKDYAVPEVWGYPMVGENPYNNTMRK.NNFARSHEETSACTIM (90)

```

CAAX

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen *KISTE18* y *ScSTE18*. Las letras de color gris indican las regiones de interacción con  $G\beta$ . El recuadro indica el extremo C-terminal en el que se encuentra la caja CAAX. El alineamiento se realizó con el programa matcher y prettyplot de EMBOSS (<http://132.248.16.25/EMBOSS/>)

En la figura 10 se observan los sitios de interacción con la subunidad  $G\beta$  muy conservados, al igual que el motivo CAAX.

Una vez que el genoma completo de *K. lactis* fue liberado, se hizo una búsqueda (blast) en la base de datos de Génolevures (Souciet *et al.*, 2005, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>) con el objetivo de encontrar secuencias similares al gen *KISTE18*, pero no se encontró ninguna secuencia que tuviera un porcentaje de identidad representativo.

## 5.2. Mutante $\Delta Kiste18$ y su Efecto en el Apareamiento.

Se hizo una mutante  $\Delta Kiste18$  con el objetivo de conocer el fenotipo que produce la ausencia de la subunidad  $G\gamma$  y saber si ésta es esencial en el sistema de apareamiento de *K. lactis*.

### 5.2.1. Construcción de la Mutante $\Delta Kiste18$ .

El gen *KISTE18* y su secuencia regulatoria, se clonaron en el plásmido pCR4-TOPO (Pérez R. sin publicar). De esa construcción obtuvimos el gen completo cortando con la enzima *EcoRI* y lo subclonamos en el plásmido Ylp352 (Fig. 11).

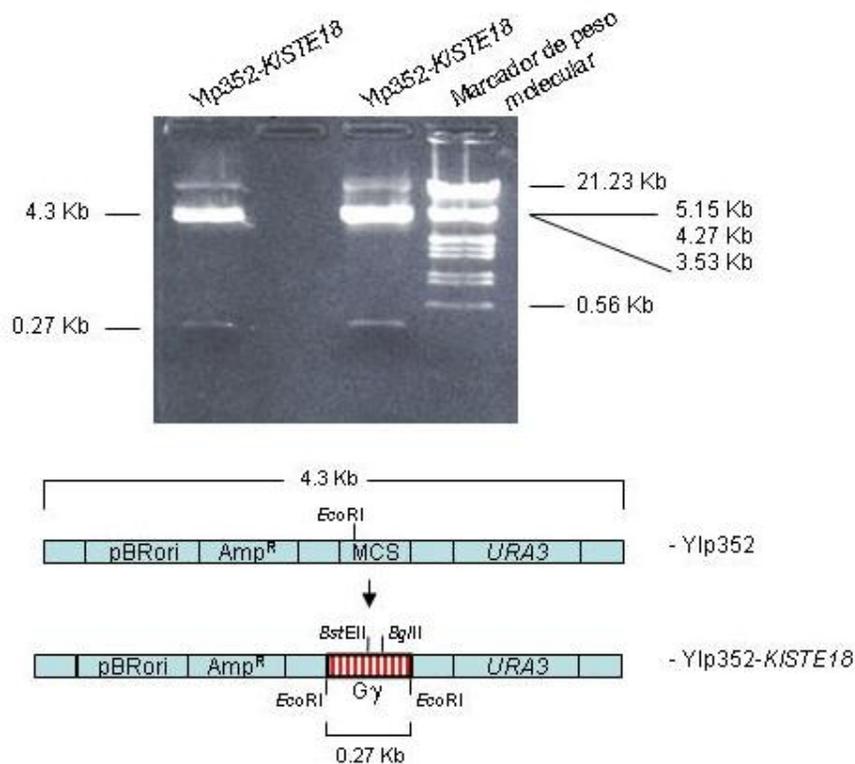


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de Ylp352-*KISTE18*. La digestión se hizo con la endonucleasa *EcoRI* a 37 °C por 1 h. Y esquema de la construcción Ylp352-*KISTE18*.

Los cuadros de color azul muestran el plásmido Ylp352, y la zona rayada representa el gen *KISTE18*. MCS es el sitio de clonación múltiple.

Para hacer la interrupción del gen, se digirió la construcción Ylp352-*KISTE18* con las enzimas *Bst*EII y *Bgl*II que cortan un fragmento de 60 pb en la mitad del ORF del gen (Fig. 11). El plásmido digerido se purificó y se utilizó para transformar las cepas 155 (*MAT* $\alpha$ ) y 12/8 (*MAT* $\alpha$ ) de *K. lactis*.

El plásmido Ylp352 contiene el gen *URA3* (Fig. 12), de tal manera que las células que integraron el plásmido en su genoma se pueden seleccionar creciéndolas en medio selectivo SD-ura.

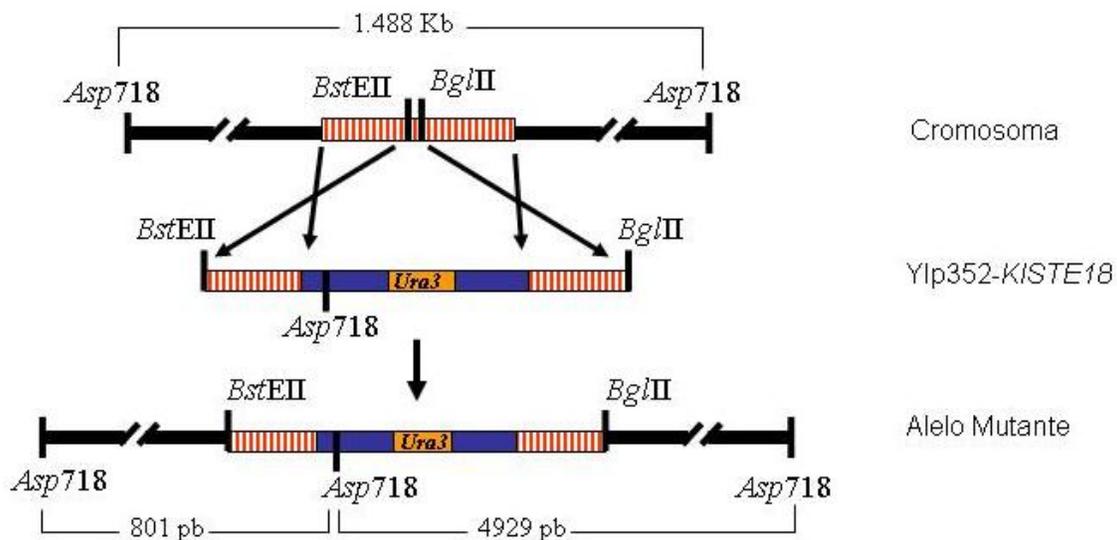


Figura 12. Esquema de la interrupción del gen *KISTE18*, con el plásmido Ylp352 y el gen *URA3*. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción que utilizamos y el tamaño de los fragmentos que se obtienen cortando con la enzima *Asp*718.

Las células transformadas se plaquearon en medio SD-ura y se incubaron a 30 °C por 48 h. Se obtuvieron ocho colonias en la cepa 12/8 (*MAT* $\alpha$ ) y diez colonias en la cepa 155 (*MAT* $\alpha$ ).

### 5.2.2. Estructura del Alelo Mutante.

Para comprobar que la estructura del alelo mutante era la esperada, se realizó una hibridación tipo Southern con el DNA cromosómico de dos colonias transformantes de cada sexo. Se incluyó como control positivo el DNA de las

cepas silvestres, una de cada sexo, este DNA se digirió con la endonucleasa *Asp718* que genera sólo un fragmento de 1.488 Kb que incluye al gen completo *KISTE18*. Una digestión con la misma enzima del DNA de las colonias transformantes, genera dos fragmentos: uno de 801 pb, y otro de 4.929 kb (Fig. 12 y 13).

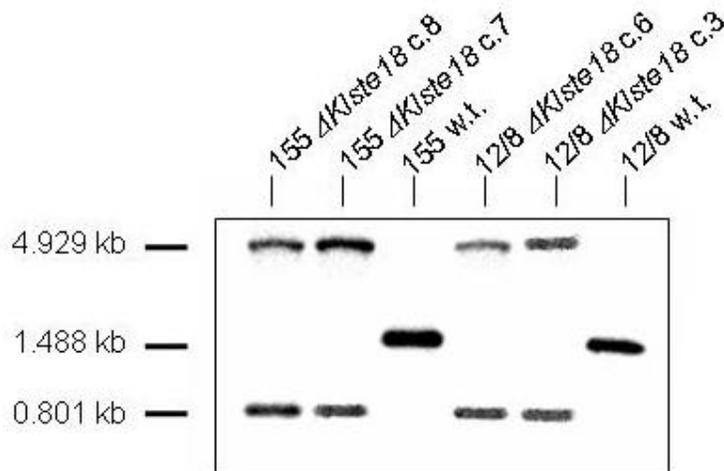


Figura 13. Hibridación tipo Southern. En los carriles que corresponden a las cepas silvestres se observa una banda de 1.488 Kb. En el resto de los carriles se muestran dos bandas de 4.929 Kb y 0.801 Kb que corresponden a las cepas mutantes. Para la digestión enzimática se utilizó la endonucleasa *Asp 718*.

Se obtuvieron dos mutantes  $\Delta Kiste18$  para cada sexo, en la figura 13 se pueden ver las dos bandas del tamaño esperado que muestran que el gen silvestre está interrumpido; se puede ver también la banda que corresponde al gen silvestre.

### 5.2.3. Caracterización Fenotípica de la Mutante $\Delta Kiste18$ .

Con el fin de observar el efecto que tiene una mutante  $\Delta Kiste18$  se hizo un ensayo de apareamiento con las mutantes obtenidas y comprobadas anteriormente. Se estriaron cepas mutantes y cepas silvestres de ambos sexos en la misma placa. Se replicaron por terciopelo contra céspedes de cepas silvestres, y se recuperaron en placas diferentes (Fig. 14). Los céspedes se hacen sembrando las células uniformemente en todo la placa, independientemente del medio que se emplee.

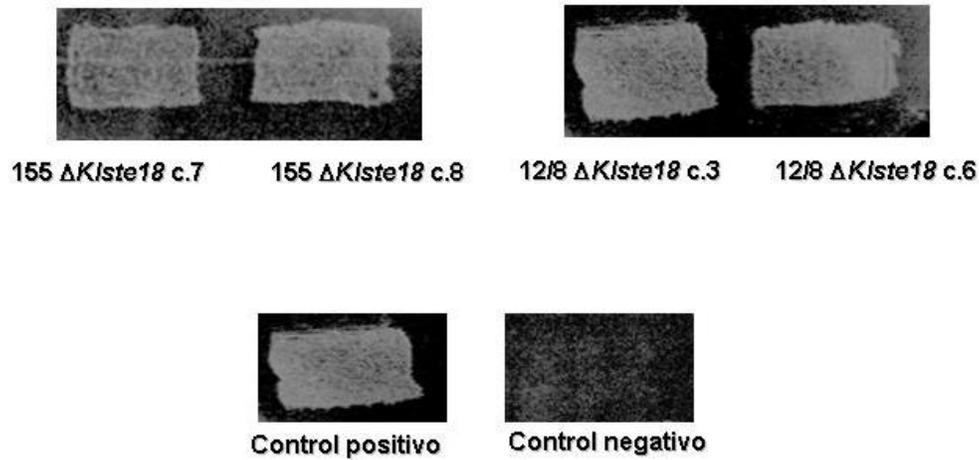


Figura 14. Diploides obtenidos por ensayo de apareamiento con las mutantes  $\Delta Klste18$ . En los cuadros superiores se muestran los ensayos hechos con dos mutantes  $\Delta Klste18$  de cada sexo.

En los cuadros inferiores se muestra el control positivo, en el que se aparearon dos cepas silvestres de sexo contrario, y el control negativo en el que se aparearon dos cepas silvestres del mismo sexo.

En la figura 14 podemos observar que las células diploides de las colonias mutantes crecieron normalmente; Este resultado muestra que las mutantes se aparean de manera similar a las cepas silvestres y sugiere que la subunidad  $G\gamma$  no es esencial en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*.

Una mutante *null* similar en *S. cerevisiae* ( $\Delta Scste18$ ), presenta fenotipo de esterilidad. Como se puede ver en la figura 15, la esterilidad de las mutantes  $\Delta Scste18$  es muy claro, a diferencia de las mutantes en *K. lactis*, que crecen de manera normal. Una mutante *null* es una mutación en el gen que elimina la función de la proteína para la que codifica.

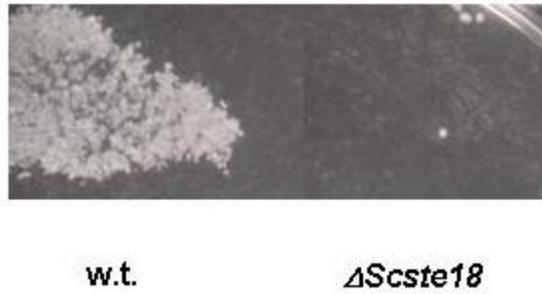


Figura 15. Diploides obtenidas por ensayo de apareamiento con mutantes  $\Delta Scste18$  de *S. cerevisiae*, y diploides de la cepa silvestre.

#### 5.2.4. Comprobación de la Expresión del Gen.

Para comprobar que el alelo mutante no se expresa se realizó una hibridación tipo northern (Fig. 16); si no se encuentra expresión del gen significará que la interrupción del gen se hizo adecuadamente. Se hizo una extracción de RNA de cepas silvestres de cada sexo, que utilizamos como control positivo, y de las colonias mutantes que se emplearon en los ensayos de apareamiento y en la hibridación tipo Southern.

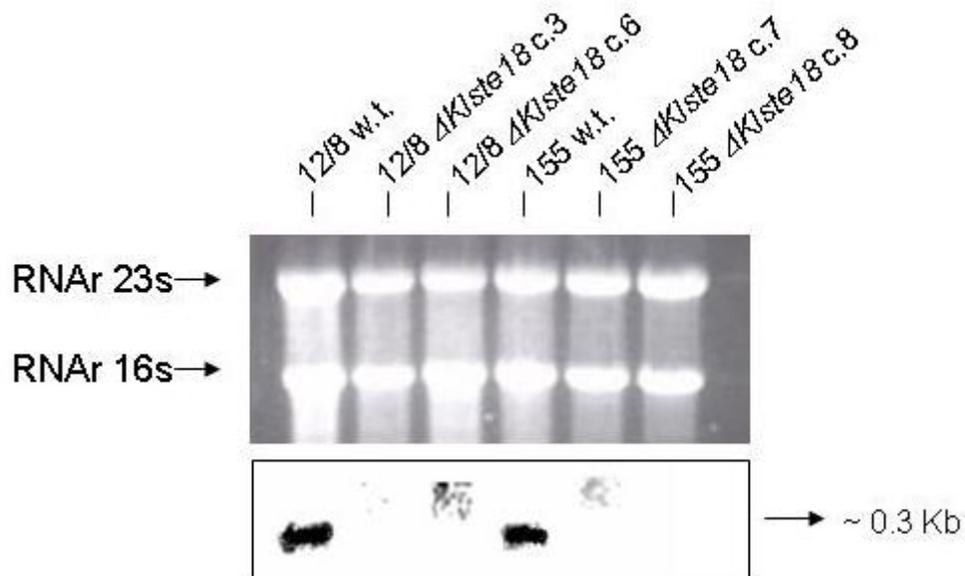


Figura 16. Gel de electroforesis e hibridación tipo Northern con RNAm extraído de las mutantes  $\Delta Klste18$  y de las cepas silvestres.

Se puede observar que no hay expresión del gen en las mutantes *null*, lo que confirma que la falta de la subunidad  $G\gamma$ , no tiene efecto en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*. Se observa un poco de expresión en los carriles de las muestras mutantes, sin embargo, no corresponden al tamaño esperado del RNAm del gen *STE18* silvestre, esto podría deberse a hibridación inespecífica, ya que la sonda que se empleó que es el gen completo, es muy pequeña (0.27 kb).

### **5.3. Interacción entre la Subunidad G $\beta$ y la Subunidad G $\gamma$ .**

Una vez que observamos que la subunidad G $\gamma$  es prescindible en el sistema, decidimos realizar ensayos en los que se pudiera observar si es posible la formación del dímero G $\beta\gamma$ , ya que no se han reportado sistemas en los que la subunidad G $\beta$  sea suficiente para la activación de la señal, ni proteínas G compuestas de sólo dos subunidades. Se hicieron ensayos de interacción proteína-proteína *in vivo* con el sistema genético de doble híbrido.

En el control positivo se utilizaron dos proteínas que se sabe que interactúan, las subunidades G $\alpha$  (*KIGPA1*) y G $\beta$  (*KISTE4*), cuya fuerte interacción ya fue previamente reportada (Ongay-Larios *et al.*, 2000). En el control negativo, se utilizó la endoquitinasa, una enzima que no está relacionada con el sistema de respuesta a feromonas y que no interactúa con la subunidad G $\gamma$ .

#### **5.3.1. Análisis Cualitativo de las Colonias con Proteínas Híbridas**

##### **Interactuantes.**

Obtuvimos doce colonias transformadas con las construcciones pEG202-KISTE18, pJG4.5-KISTE4 y pSH18-34, que crecieron en medio selectivo (SD-ura-his-trp). También obtuvimos colonias de los controles positivo y negativo, que crecieron en el mismo medio selectivo.

En una placa con medio SGal+ade+leu con X-gal al 2% se estriaron las doce colonias experimentales que se obtuvieron (pEG202-KISTE18 – pJG4.5-KISTE4); en la misma placa se estriaron cinco colonias del control positivo (pEG202-KIGPA1 – pJG4.5-KISTE4) y cinco del control negativo (pEG202-KISTE18 – pJG4.5-Endoch). Se crecieron a 30 °C por 48 h. (Fig. 17).

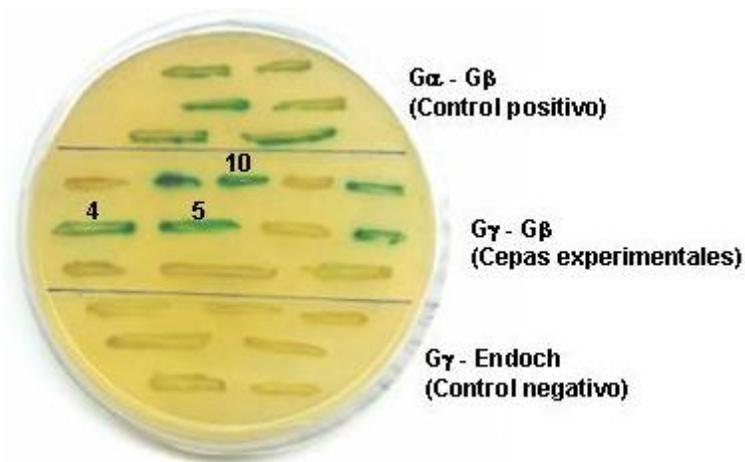


Figura 17. Análisis cualitativo de las colonias transformadas. El medio utilizado es SGal+ade+leu con X-gal. Los números 4, 5 y 10 señalan las colonias que elegimos para realizar el ensayo cuantitativo de  $\beta$ -galactosidasa.

De las colonias experimentales se pueden ver seis que se tiñeron de color azul intenso (Fig. 17), lo que nos indica que éstas tienen proteínas híbridas que interactúan. Las clonas que crecimos del control positivo se ven todas de color azul, algunas de las colonias experimentales se ven con un color más intenso que los controles positivos y otras no se tiñeron de color azul, lo que podría deberse a la cantidad de proteína que tienen: entre más proteína, la intensidad de la coloración es mayor, porque hay más actividad del reportero.

### 5.3.2. Análisis Cuantitativo de la Actividad de la $\beta$ -galactosidasa.

Se seleccionaron tres de las colonias que se tornaron de color azul para hacer un ensayo cuantitativo del reportero  $\beta$ -galactosidasa. Las colonias que utilizamos están marcadas con los números 4, 5 y 10 en la figura anterior. En total se realizaron tres ensayos de  $\beta$ -galactosidasa. Los dos primeros experimentos se hicieron con las colonias 5 y 10 y en el tercero se incluyó también a la colonia 4. Los tres experimentos se hicieron por triplicados de cada muestra y se incluyeron los mismos controles positivos y negativos que se utilizaron en el análisis cualitativo (Fig. 18).

En la gráfica (Fig. 18) se puede ver que hay una alta interacción entre las subunidades  $G\gamma$  y  $G\beta$ , incluso mayor que la interacción que presenta el control positivo; Éste resultado es de esperarse, ya que  $G\gamma$  y  $G\beta$  forman un dímero en los sistemas que ya se han descrito.

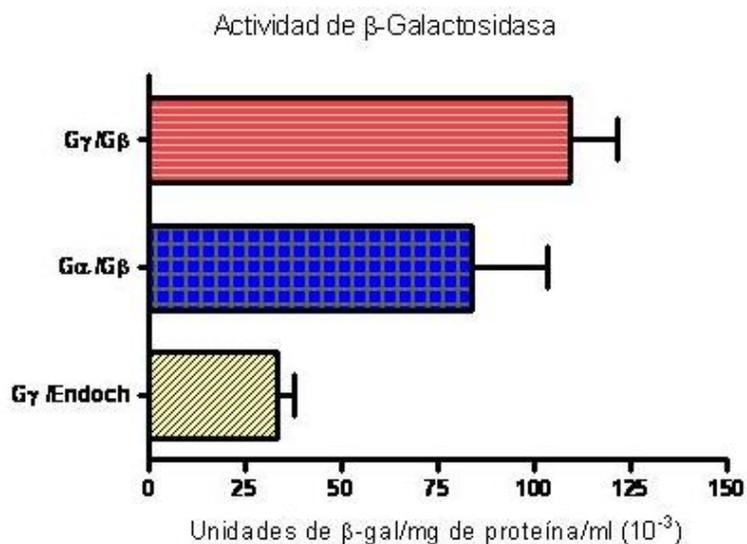


Figura 18. La gráfica muestra un promedio del valor de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en las colonias experimentales ( $G\gamma/G\beta$ ), del control positivo ( $G\alpha/G\beta$ ) y el control negativo ( $G\gamma/Endoch$ ). Las barras indican el error estándar.

## 5.4. Expresión del Gen Mutante *Klste18<sup>ser87</sup>*.

Se sabe que la subunidad  $G\gamma$  sufre una farnesilación post-traducciona. En *K. lactis* el motivo CAAX está altamente conservado, lo que indica que la subunidad  $G\gamma$  en ésta levadura podría farnesilarse, y así hacer más eficiente la respuesta a feromonas de apareamiento. La farnesilación se hace en el residuo de cisteína del motivo CAAX en el extremo carboxilo-terminal; Una mutante *Scste18<sup>ser107</sup>* en *S. cerevisiae*, que tiene un cambio de éste residuo de cisteína por una serina, es negativa porque inhibe el apareamiento y es dominante porque cuando compete con el gen silvestre, no se activa el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento, esto podría deberse a que la subunidad  $G\gamma$  mutante secuestra a la subunidad  $G\beta$  y al no poder anclarse a la membrana, no se activan los efectores que se encuentran río abajo del dímero (Hirschman y Jenness, 1999). En nuestro trabajo se hizo una mutante *Klste18<sup>ser87</sup>* en *K. lactis*, que es una mutación equivalente a *Scste18<sup>ser107</sup>*, ya que tiene un cambio de la cisteína del motivo CAAX por una serina, el objetivo de este experimento es conocer el fenotipo que produce ésta mutante en *K. lactis*.

### 5.4.1. Construcción del Gen Mutante *Klste18<sup>ser87</sup>*.

La mutación se hizo por medio de PCR. Se diseñó un oligodexonucleótido con un cambio de un nucleótido timina por adenina en la posición +259, que se traduce en el cambio de un residuo de aminoácido completo: cisteína 87 por serina (Pérez R. sin publicar).

Se hicieron dos construcciones, ambas en el plásmido YEpKD352; Una de ellas se hizo con el gen mutante y la segunda con el gen silvestre para utilizarlo como control positivo.

Obtuvimos las siguientes dos construcciones: YEpKD352 - *KISTE18* y YEpKD352 - *Klste18<sup>ser87</sup>* (Fig. 19).

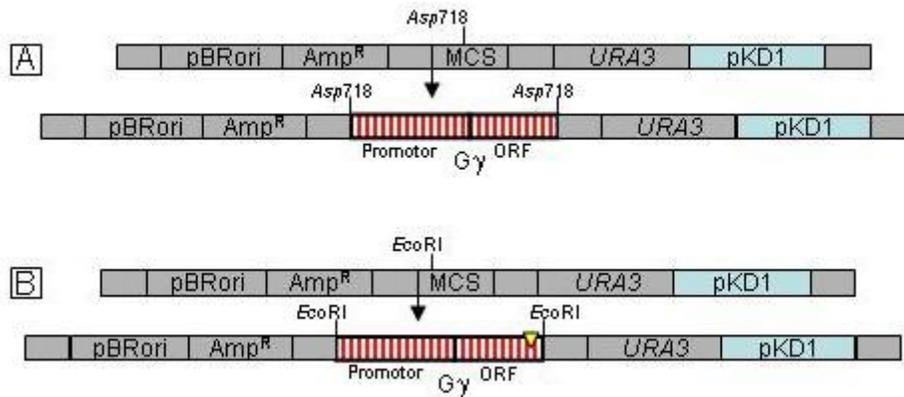


Figura 19. Esquema de las construcciones YEp352- *KISTE18* y YEpKD352- *Klste18*<sup>ser87</sup>. Los cuadros de color gris muestran la estructura de los plásmidos, en color gris claro se muestra el origen de replicación pKD1 para *K. lactis*. La zona rayada representa el gen *KISTE18*, con un triángulo se muestra el sitio de la mutación. MCS es el sitio de clonación múltiple.

#### 5.4.2. Efecto de la Expresión de *Klste18*<sup>ser87</sup> en *K. lactis*.

Se transformaron las cepas 155 (*MAT* $\alpha$ ) y 12/8 (*MAT* $\alpha$ ), con el gen silvestre, el gen mutante y el plásmido YEpKD352, de forma que se hicieron 6 diferentes transformaciones (Fig. 20).

Realizamos ensayos de apareamiento de las colonias transformantes contra céspedes de las cepas silvestres del sexo contrario.

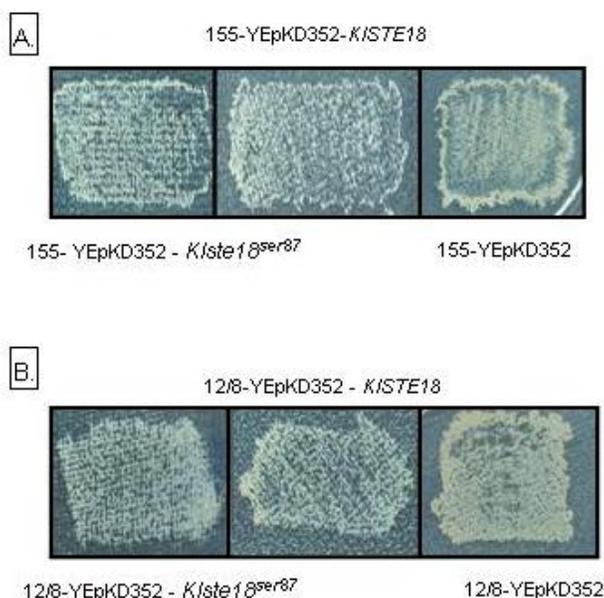


Figura 20. Diploides obtenidos por ensayos de apareamiento con *K. lactis*. Los cuadros de la izquierda muestran las células obtenidas del apareamiento de la mutante *Klste18*<sup>ser87</sup>. En los cuadros centrales se muestra el control positivo que es el plasmido con el gen silvestre. En los cuadros de la derecha se muestra un control positivo del plasmido sin insertos. A) Las transformaciones se hicieron en la cepa 155 *MAT $\alpha$*  y el apareamiento se hizo contra la cepa 12/8 silvestre, B) Las transformaciones se hicieron en la cepa 12/8 *MAT $\alpha$*  y el apareamiento se hizo contra la cepa 155 silvestre. En cada caso se probaron 10 colonias, en la figura sólo se muestra una colonia representativa para cada apareamiento. Las células diploides fueron recuperadas en medio mínimo SD.

En la figura 20 se observa que las células diploides resultantes del apareamiento de las colonias mutantes, crecieron de manera similar a los controles positivos, esto nos indica que el apareamiento fue eficiente, en todas las colonias que se probaron. Éste resultado es congruente con los resultados que obtuvimos anteriormente en este trabajo, ya que observamos que una mutante  $\Delta Klste18$  no es estéril. Confirmando así, que la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* no es esencial en el sistema de respuesta a feromonas.

#### 5.4.3. Efecto de la Expresión de *Klste18*<sup>ser87</sup> en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* las mutantes *ste18*<sup>ser107</sup> son mutantes negativas dominantes, como se mencionó anteriormente. Se hicieron transformaciones de la cepa W303-1A con el gen mutante *Klste18*<sup>ser87</sup> para saber si esta mutación también es

dominante en *S. cerevisiae*, como la mutante *Scste18<sup>ser107</sup>* o si tiene algún efecto en el apareamiento (Fig. 21).

Las construcciones se hicieron de manera similar que en *K. lactis*, solamente que se empleó el plásmido YEp352 que posee el origen de replicación 2 $\mu$ , que es de *S. cerevisiae*. También se hicieron transformaciones con el gen silvestre y el plásmido YEp352, como controles positivos.

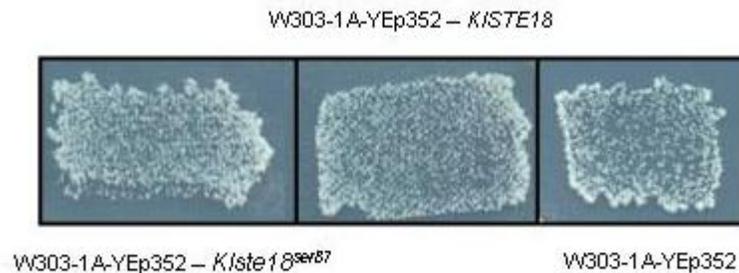


Figura 21. Diploides obtenidas por ensayos de apareamiento con *S. cerevisiae*. El cuadro de la izquierda muestra las células obtenidas del apareamiento de la mutante *Kiste18<sup>ser87</sup>* en la cepa W303-1A *MAT $\alpha$*  contra la cepa 70 *MATa* que es silvestre.

En el cuadro central se muestra el control positivo que es el plasmido YEp352 con el gen silvestre *KISTE18*. En el cuadro de la derecha se muestra un control positivo del plasmido YEp352 sin insertos. En cada caso se probaron 10 colonias, en la figura sólo se muestra una colonia representativa para cada apareamiento. Las células diploides fueron recuperadas en medio mínimo SD.

Se puede observar en la figura 21 que la mutación no tiene un efecto aparente en la vía de respuesta a feromonas de *S. cerevisiae*, ya que las mutantes *Kiste18<sup>ser87</sup>* se aparean de forma normal, a diferencia de lo que sucede con las mutantes *Scste18<sup>ser107</sup>*, en las que el fenotipo es claramente estéril.

## 6. Discusión.

El gen *STE18* que codifica para la subunidad  $G\gamma$  de la proteína G heterotrimérica, es claramente necesario en la respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae*, los ensayos de apareamiento hechos con las mutantes  $\Delta Scste18$  demostraron que dichas mutantes son estériles, además de ser deficientes en la síntesis y en la secreción de feromonas de apareamiento (Whiteway *et al.* 1989). Este gen codifica para una proteína que es similar a la cadena  $\gamma$  de la transducina de bovino (Hurley *et al.*, 1984) ambas son pequeñas proteínas hidrofílicas con una secuencia CAAX muy conservada en su extremo carboxilo (Clarke *et al.*, 1988). Las subunidades  $G\beta$  y  $G\alpha$  de *K. lactis* están altamente conservadas,  $G\gamma$  también está bien conservada, aunque presenta más variabilidad en su estructura; Sin embargo, una mutante  $\Delta Klste18$  en *K. lactis* parece no tener efecto en el apareamiento, lo que indica que la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* no participa o puede ser dispensable en esta vía de respuesta a feromonas; Este resultado es contrario a lo que se ha descrito anteriormente en sistemas similares, ya que no hay reportes de subunidades  $G\beta$  que puedan activar la cascada de señalización por sí solas, ni tampoco se han reportado proteínas G que no estén formadas por tres subunidades.

La estructura deducida del cristal del heterodímero  $G\beta\gamma$  de la proteína G de la transducina revela una estructura de propela característica, compuesta por 7 hojas  $\beta$ -plegadas; El extremo amino-terminal de  $G\beta$  se extiende como una estructura enrollada sobre el extremo amino-terminal de la subunidad  $G\gamma$  (estructura conocida como "coiled-coil") de forma que entra en contacto con las hojas 4 y 5 (Sondek *et al.*, 1996) (Fig. 5). En *S. cerevisiae* la estructura del dímero es similar (Dowell *et al.*, 1998),  $G\beta$  y  $G\gamma$  forman una estructura muy estable, que sólo puede ser disociada por desnaturalización (Hamm, 1998).

La secuencia primaria de las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  de *K. lactis*, muestra que los dominios de interacción entre ellas están altamente conservados; Estas observaciones junto con los datos reportados acerca de la interacción entre las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , nos indicaban que probablemente se podía formar el dímero

G $\beta\gamma$  en *K. lactis*. Para comprobar esta hipótesis, realizamos un ensayo de interacción con el sistema genético de doble híbrido, y encontramos que la interacción entre estas subunidades es muy fuerte. Aunque no tenemos los datos necesarios para afirmar la formación del heterodímero, podemos concluir que es muy posible que la subunidad G $\gamma$  se encuentre asociada a G $\beta$  en el sistema de respuesta a feromonas, a pesar de no ser esencial.

Se ha encontrado que el 40% del total de los dímeros G $\beta\gamma$  en la célula se encuentran asociados a la membrana plasmática, el resto se encuentra en membranas internas o en forma libre (Hirschman *et al.*, 1997). La asociación estable del dímero G $\beta\gamma$  con la membrana plasmática depende de su interacción con la subunidad G $\alpha$ , más no depende de su interacción con el receptor (Hirschman *et al.*, 1997). El heterodímero es capaz de anclarse a la membrana plasmática por una modificación lipídica post-traducciona, una farnesilación en el extremo carboxilo-terminal de la subunidad G $\gamma$  (Fig. 4). La localización del dímero en la membrana plasmática es importante porque permite la reasociación del heterotr trímero cuando la señal ha terminado, y así la inactivación de la cascada de MAPK y la restitución del ciclo celular (Whiteway y Thomas, 1994; Grishin *et al.*, 1994). Se han hecho mutaciones directas, deleciones y sustituciones, en la cisteína 107 de *STE18* de *S. cerevisiae* y se ha observado que este aminoácido es indispensable para que se lleve a cabo la farnesilación que a su vez es esencial para la activación de la respuesta a feromonas de apareamiento (Whiteway y Thomas, 1994; Grishin *et al.*, 1994; Chinault y Blumer, 2003; Hamm, 1998) (Fig. 4). El efecto negativo dominante de una mutante *Ste18*<sup>ser107</sup> se debe tal vez, a que la subunidad G $\gamma$  secuestra a la subunidad G $\beta$ , impidiendo su acercamiento a la vecindad del receptor, de forma que es dominante sobre la subunidad G $\gamma$  silvestre e impide la transducción de la señal. Se ha reportado también que la subunidad G $\beta$  interviene en el intercambio de GDP/GTP en la subunidad G $\alpha$ , los autores sugieren que la subunidad G $\beta$  mantiene a la subunidad G $\alpha$  en la posición adecuada para que la liberación de GDP ocurra, y para esto es necesaria la localización del dímero en la membrana (Ford *et al.*, 1998; Hamm, 1998; Ongay-Larios *et al.*, 2000).

Conociendo estos antecedentes hicimos una mutante *Klste18<sup>ser87</sup>* que tiene sustituida la cisteína de la caja CAAX, por una serina. Observamos que las mutantes se siguen apareando de forma normal, aunque esperaríamos que la eficiencia del apareamiento se viera afectada. No podemos aseverar que la mutante no fue farnesilada, tal vez se requiere hacer una mutación en la farnesiltransferasa para comprobar el fenotipo observado; Otra hipótesis es que esta mutación es recesiva en *K. lactis*, por lo que sería interesante hacer una mutante  $\Delta Klste18$ - *Klste18<sup>ser87</sup>* y observar la respuesta a feromona para determinar si la mutación *Klste18<sup>ser87</sup>* es recesiva o si simplemente no afecta la vía. Sin embargo, el resultado que obtuvimos es congruente con nuestras observaciones anteriores, ya que la mutante  $\Delta Klste18$  tampoco tiene efecto en el apareamiento, confirmando así que la subunidad  $G\gamma$  es dispensable en el sistema de apareamiento de *K. lactis*.

Nuestros resultados indican que a pesar de que es posible la formación del dímero  $G\beta\gamma$ , la subunidad  $G\gamma$  es dispensable en el sistema, contrario a lo que se ha reportado acerca de las proteínas G heterotriméricas que responden a feromonas de apareamiento. Creemos que la función de la subunidad  $G\gamma$  en *K. lactis* es potenciar la respuesta a feromonas, sin ser esencial. Sin embargo, no se han reportado subunidades  $G\beta$  que actúen en forma monomérica. Se ha observado que la subunidad  $G\beta$  posee sitios de interacción con las MAPK que se activan río abajo (Dowell *et al.*, 1998; Akada *et al.*, 1996) pero no se han reportado sitios en la subunidad  $G\gamma$  que interactúen con estos efectores río abajo; Es posible que  $G\beta$  en *K. lactis* sea suficiente para activar la cascada de señalización ya que el mecanismo de activación es independiente del anclaje del heterodímero en la membrana.

Aún cuando esta opción sea posible, la subunidad  $G\beta$  es una proteína citosólica, por lo que sería difícil que se encontrara en la vecindad del receptor. Podría ser que  $G\beta$  de *K. lactis* sufra alguna modificación lipídica que le permite asociarse a la membrana plasmática, o que se asocie a la subunidad  $G\alpha$  y de esta forma se sitúe en la cercanía del receptor.

Existe, sin embargo, la posibilidad de que  $G\beta$  no se requiera para activar los efectores río abajo, y que la subunidad  $G\alpha$  sea suficiente para realizar esta

actividad, siendo  $G\beta$  sólo un modulador de la actividad de  $G\alpha$ . Empero, hemos observado en el laboratorio que una mutante  $\Delta K1ste4$  es estéril.

La importancia de nuestros resultados radica en que las proteínas G están involucradas en una gran variedad de respuestas a diferentes estímulos. En células de mamíferos las proteínas G tienen múltiples papeles incluyendo la regulación de varias isoformas de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, canales de potasio, canales de calcio dependientes de voltaje, canales de sodio y receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Dowell *et al.*, 1998; Hamm, 1998). La subunidad  $G\alpha$  en mamíferos, al igual que en *K. lactis*, tiene un papel positivo en el sistema, ya que tiene efectores río abajo, lo que hace aún más importante la descripción de la vía de señalización en respuesta a feromonas en ésta levadura.

## 7. Conclusiones.

El gen *KISTE18* codifica para la subunidad  $G\gamma$  de la proteína G heterotrimérica en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento.

La proteína KISTe18p no es esencial en el proceso de apareamiento.

Hay una fuerte interacción entre las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  lo que nos indica la posible formación del heterodímero.

Las colonias que expresan *KIste18<sup>ser87</sup>* siguen apareándose de forma normal, confirmando así, que KISTe18p no se requiere en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento de *K. lactis*.

## 8. Perspectivas.

En este trabajo comprobamos que la subunidad  $G\gamma$  no participa en el sistema de repuesta a feromonas de apareamiento de *K. lactis*. Sin embargo, se demostró que esta subunidad presenta una alta interacción con KIS $\sigma$ 4p.

Un ensayo de co-inmunoprecipitación, podría servir para confirmar la formación del heterodímero en esta vía.

Es importante cuantificar la eficiencia de los apareamientos de las mutantes  $\Delta$ KIS $\sigma$ 18, ya que podría ser menor que en las cepas silvestres, confirmando así la hipótesis de que KIS $\sigma$ 18p hace más eficiente la respuesta a feromonas, sin ser esencial.

En este trabajo observamos que KIS $\sigma$ 18<sup>ser87</sup> no es esencial en el apareamiento, pero los ensayos no fueron suficientes para determinar si esta mutación es recesiva. Por lo tanto es importante hacer una mutante  $\Delta$ KIS $\sigma$ 18-KIS $\sigma$ 18<sup>ser87</sup> y observar el efecto que produce en el apareamiento.

Probablemente otra de las funciones de la subunidad  $G\gamma$  es la activación de los efectores, por esto es importante la realización de ensayos de interacción entre el dímero KIS $\sigma$ 4p/KIS $\sigma$ 18p y sus posibles efectores, así como ensayos de interacción con la subunidad KIS $\sigma$ 4p y sus posibles efectores.

## 9. Apéndice.

En experimentos recientes encontramos que la interrupción del gen *KISTE18* (subunidad  $G\gamma$ ) reduce el apareamiento significativamente.

Se realizaron ensayos cuantitativos de apareamiento, que consisten en poner un millón de células de cada sexo que se va a aparear en 100 ml de medio YPD, el apareamiento se deja por 5 h. y transcurrido ese tiempo se hacen diluciones 1:100 con agua estéril, se plaquean en medio SD, y se dejan incubando a 37 °C por dos días. Se observó que la eficiencia del apareamiento se reduce al 20%. Esta reducción del apareamiento no puede observarse claramente en los apareamientos realizados por parches (Fig.22).

Estos resultados sugieren que *KISte18p* no es esencial en el apareamiento, porque las mutantes  $\Delta*KIste18*$  se pueden aparear, sin embargo, la eficiencia de este evento se reduce, sugiriendo así que la subunidad *KISte18p* participa en el sistema pero no es esencial.

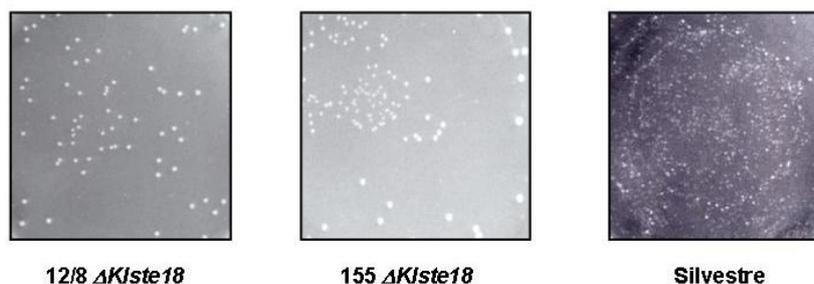


Figura 22. Apareamiento cuantitativo con las mutantes  $\Delta*KIste18*$  en cada sexo. Como control positivo se hizo un apareamiento entre cepas silvestres.

## 10. Bibliografía.

1. Adams A., Gottschling D. E., Kaiser C. A., y Stearns T., 1997. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 177 pp.
2. Akada R., Kallal L., Jonson D., y Kurjan J. 1996. Genetic Relationships Between the G Protein  $\beta\gamma$  Complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42p: Investigation of Effector Roles in the Yeast Pheromone Response Pathway. *Genetics*, 143(1): 103-117.
3. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., y Struhl K., 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Nueva York. 456 pp.
4. Basu J. 2004. Protein palmitoylation and dynamic modulation of protein function. *Current Science*, 87 (2):212-217.
5. Cabrera-Vera T., Vanhauwe J., Thomas T., Medkova M., Preininger A., Masón M., y Hamm H. 2003. Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews*, 24(6): 765-781.
6. Campbell I., y Duffus J.H., 1988. *Yeast: A practical Approach*. IRL Press. Oxford, Inglaterra. 511 pp.
7. Clarke S., Vogel J., Deschenes R., y Stock J. 1988. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: Evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 4643- 4647.
8. Coria R., Saviñon-Tejeda A., y Bimbaumer L. 1995. STE2/SCG1-dependent inhibition of STE4-induced growth arrest by mutant STE4deltaC6 in the yeast pheromone response pathway. *FEBS Letters*, 367(2): 122-126.
9. Coria R., Kawasaki L., Torres-Quiroz F., Ongay-Larios L., Sánchez-Paredes E., Velásquez-Zavala N., Navarro-Olmos R., Rodríguez-González M., Corachán-Aguilar R., y Coello G. 2005. The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, publicación en línea, <http://www.blackwell-synergy.com/toc/fyr/0/0>
10. Chen X.J., Wesolowski-Louvel M., Tanguy-Rougeau C., Bianchi M.M., Fabiani L., Saliola M., Falcone C., Frontali L., y Fukuhara H. 1988. A gene-cloning system for *Kluyveromyces lactis* and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production. *Journal of Basic Microbiology*, 28(4): 211-220.

11. Chinault S. y Blumer K. 2003. The C-terminal Tail Preceding the CAAX Box of a Yeast G Protein  $\gamma$  Subunit Is Dispensable for Receptor-mediated G Protein Activation *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23): 20638-20644.
12. Dickinson J.R. y Schweizer M. 2004. The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Segunda edición. CRC Press. 459 pp.
13. Dolhman H. G., 2002. G Proteins and Pheromone Signaling. *Annual Reviews of Physiology*, 64:129-52.
14. Dowell S., Bishop A., Dyos S., Brown A., y Whiteway M. 1998. Mapping of a Yeast G Protein  $\beta\gamma$  Signaling Interaction. *Genetics*, 150: 1407-1417.
15. Fields S. y Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230):245-246
16. Finley R. Jr., Brent R., Glover D. M., y Hames B. D., 1995. DNA Cloning 2: A practical Approach, Expression Systems, Segunda edición. Ed. Oxford University Press. 542 pp.
17. Ford C., Skiba N., Bae H., Daaka Y., Reuveny E., Shekter L., Rosal R., Weng G., Yang C., Lyengar R., Miller R., Jan L., Lefkowitz R., y Hamm H. 1998. Molecular Basis for Interactions of G Protein  $\beta\gamma$  Subunits with Effectors. *Science*, 280: 1271-1274.
18. Grishin A., Weiner J., y Blumer K. 1994. Biochemical and Genetic Analysis of Dominant-Negative Mutations Affecting a Yeast G-Protein  $\gamma$  Subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (7): 4571-4578.
19. Hamm H. 1998. The Many Faces of G Protein Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (2): 669-672.
20. Hirschman J., De Zutter G., Simonds W., y Jenness D. 1997. The  $G\beta\gamma$  Complex of the Yeast Pheromone Response Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:240-248.
21. Hirschman J. E. y Jenness D. D. 1999. Dual Lipid Modifications of the Yeast  $G\gamma$  Subunit Ste18p Determines Membrane Localization of  $G\beta\gamma$ . *Molecular and Cellular Biology*, 19 (11): 7705-7711.
22. Hoffman C. S., y Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57 (2-3):267-272.

23. Hurley J., Fong., Teplow D., Dreyer W., y Simon M. 1984. Isolation and characterization of cDNA clone for the  $\gamma$  subunit of bovine retinal transducin. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 81:6948-6952.
24. Jones E.W., Pringue J.R., y Broach J.R. 1992. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York. 810 pp.
25. Kawasaki L., Saviñon-Tejeda A. L., Ongay-Larios L., Ramírez J., y Coria R. 2005. The G $\beta$  (KlSte4p) subunit of the heterotrimeric G protein has a positive and essential role in the induction of mating in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 22: 947-956.
26. Kocková-Kratochvílová A. 1990. Yeast and Yeast-like Organisms. VCH publishers, Nueva York. 528 pp.
27. Lloret A., Saviñon-Tejeda A., Ongay-Larios L., Tenorio E.P., y Coria R. 2003. The KIFUS1 gene is required for proper haploid mating and its expression is enhanced by the active form of the G $\alpha$  (Gpa1) subunit involved in the pheromone response pathway of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (1): 105-113.
28. Lucotte G., y Baneyx F., 1993. Introduction to Molecular Cloning Techniques. Ed. VCH Publishers, Inc. 478 pp.
29. Ma Y-T., y Rando R.R.1992. A microsomal endopeptidase that specifically cleaves isoprenylated peptides. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 89: 6275-9, 1992.
30. Magee T., y Marshall C.1999. New insights into interaction Ras with plasma membrane. *Cell*, 98: 9-12.
31. Miller J. H., 1992. Experiments in Molecular Genetics. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. 520 pp.
32. Nasim A., Young P., y Johnson B.F. 1989. Molecular Biology of the Fission Yeast. Academic Press Inc. California. 469 pp.
33. Ongay-Larios L., Saviñon-Tejeda A. L., Williamson Jr. M. J., Durán-Avelar M. J., y Coria R. 2000. The Leu-132 of the Ste4 (G $\beta$ ) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2  $\alpha$  factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Letters*, 467: 22-26.
34. Sambrook J., Fritsch E. F., y Maniatis T., 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual, Segunda edición. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1035 pp.

- 35.** Saviñon-Tejeda A. L., Ongay-Larios L., Valdés-Rodríguez J., y 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*. *Journal of Bacteriology*, 183: 229-234.
- 36.** Schaffrath R. y Breuning K. D. 2000. Genetics and Molecular Physiology of the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 173-190.
- 37.** Sondek J., Bolum A., Lambright D., Hamm H., y Sigler P. 1996. Crystal structure of a G-protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1Å resolution. *Nature*, 379(6563): 369-374.
- 38.** Souciet J., Thiery A., Wésolowsk-Louvel M., Casaregola S., Gaillardin C. y Sherman D. Última actualización: 2005. Génolevures: Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeast. Bordeaux, Center for Bioinformatics, disponible en: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>.
- 39.** Spencer J.F.T., Spencer D.M., y Smith A.R.W. 1983. Yeast Genetics Fundamental and Applied Aspects. Springer-Verlag New York Inc., Nueva York. 533 pp.
- 40.** Whiteway M., Hougan L., Dignard D., Thomas D., Bell L., Saari G., Grant F., O'Hara P., y MacKay 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: 467-477.
- 41.** Whiteway M. S. y Thomas D. Y. 1994. Site-Directed Mutations Altering the CAAX Box of the Ste18, the Yeast Pheromone-Response Pathway  $G\gamma$  Subunit. *Genetics*, 137: 967-976.