



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Participación del receptor para la  
feromona a (KlSte2) del sistema de respuesta a  
feromonas de *Kluyveromyces lactis*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Miriam Beatriz Rodríguez González**

**TUTOR: Dr. Roberto Coria Ortega**



**2007**



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.

## Hoja de datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Rodríguez

González

Miriam Beatriz

21562762

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

098175000

### 2. Datos del tutor

Dr.

Roberto

Coria

Ortega

### 3. Datos del sinodal 1

M. en C.

Edith

Sánchez

Paredes

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

### 5. Datos del sinodal 3

I. B. Q.

Hector

Quezada

Pablo

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.

María Teresa

Lara

Ortiz

### 7. Datos del trabajo escrito

“Participación del receptor para la feromona a (KlSte2)

del sistema de respuesta a feromonas de *Kluyveromyces lactis*”

49 p

2007

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

DGPA-PAPIIT IN-209602 y CONACYT 44178

A la mujer de inagotable valentía y ganas de vivir  
a la señora Sotera Rosas Olvera<sup>†</sup>

A la pequeña que con sus enormes manos cubre mis cansancios  
y me llena de olvidos y esperanzas  
a mi sobrina Natalia

## Agradecimientos

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al IFC por ser mis lugares de estudio, por ser los sitios forjadores de mis pensamientos.

Gracias al Doctor Roberto Coria, por todo el apoyo y la paciencia. Por el espacio otorgado, por introducirme en la investigación, y gracias por los buenos ratos.

Un agradecimiento a mis sinodales; Hector, Alfonso, Tere, Edith, gracias por los comentarios y las sugerencias.

A las personas que son mi contrafuerte:

Gracias “nana”, por las ideas compartidas y por las no compartidas, por ser una persona ejemplar y por el apoyo, gracias Ariana por tu necesidad.

A Sandra, gracias por ser mi compañera de juego, de vida, gracias por tu serenidad, por dejarme ser parte de tu familia, te lo agradezco “flaca”.

A Victor, muchas gracias por darme más que vida, por enseñarme que pese a las carencias si uno trabaja duro puede salir adelante, gracias papá por esforzarte, gracias entrenador.

Gracias Lourdes, por dedicar tu vida a tus hijas, por enseñarme a amar, a perdonar, gracias mamá por toda la bondad de tu ser.

Gracias al laboratorio 302.ote y anexos;

A Laurita Kawasaki, muchas gracias por resolver mis dudas, por apoyarme y sobre todo gracias por tu sorprendente paciencia y por las carcajadas compartidas.

A la doctora Laura Ongay, por sus platicas amenas, por sus sugerencias, gracias por resolver mis dudas, por su simpatía.

Gracias a Mine y a Lupita por permitirme tratarlas.

A Gerardo Coello por las pláticas, por sus chistes y por la sonrisa que siempre portas.

Gracias a Mari por mantener el orden y gracias por las charlas.

A Alan que siempre esta lleno de sorpresas, gracias por amenizar el laboratorio.

Gracias Paco por tu a veces extraña manera de ser, por ser tan chistoso, gracias por toda la ayuda y por dejarme ver la excelente persona que eres. Y sobre todo agradezco la música.

A Emanuel por convertirse en un gran amigo, en un buen compañero, por compartir sus gustos. Gracias por los partidos de ajedrez y las charlas.

Rocío gracias por la amistad, por tus locuras, gracias por escucharme y por dejarme escucharte, y agradezco la confianza y el apoyo que a tu manera me brindas.

Edith, gracias por la ayuda, por prestarme tu atención, por tu humor, gracias por lo bueno y lo malo que a veces nos damos. Pero sobre todo gracias por mostrarme lo que a veces no quiero ver de mi.

Nancy, gracias por la felicidad y sencillez que siempre irradias, por escucharme, gracias por apoyarme en los momentos extraños y por impulsarme a hacer lo que deseo, gracias.

Gracias a las tres (Nancy, Rocío, y Edith), por las noches de parranda, de baile, que espero sean más. Muchas gracias por apoyarme en los tiempos difíciles, gracias por tratar de entenderme cuando ni yo me entendía.

Gracias a los compañeros de piso; a Cristian, por brindarme su amistad, gracias por tratar de entenderme, a Luis, a Sergio, a Manuel, a Memo a Hugo, a Rodrigo, a Daniela y Gisela por las reuniones y por amenizar el pasillo.

Gracias a mis amigos;

Al "oaxa" (Victor), y a la "bechas" (Betsaida), por un cariño de años que se conserva, gracias por su confianza.

Oaxa gracias por ayudarme a levantar, y por aparecerte cada que necesito ayuda. Agradezco poder escucharte.

Bechas gracias por las aventuras y el tiempo compartido. Por seguir en mi vida pese a los cambios.

A Tonathiu, gracias por ser un constante en mi vida, por abrazarme con fuerza cuando lo necesitaba.

A Itzel y a Angelina por no permitir que nos perdamos, gracias también a Mariana y a Lizbeth. Gracias a todas ustedes por tantos años, por una infancia, una adolescencia y una madurez compartidas. Agradezco a Itzel por los sueños compartidos y las locuras.

A Edgardo, Hugo, y Eric, gracias por las platicas, por los juegos de baraja. Gracias por acordarse de mi. Eric, te agradezco tu amistad y tu impulsivo carácter.

Agradezco a mis compañeros de museo, Ociel, Benjamín, Citlally, Monica, Josue, Sinhe e Ivan. Gracias por charlar conmigo y por compartir conmigo mi corta estancia.

Gracias también a Vanesa, a Abraham, a Violeta por las platicas y las sonrisas compartidas.

A Nayelli por su amistad, por las largas charlas bajo el sol, por su tiempo y alegría.

Fernando gracias por tu compañía, por la confianza compartida, por los dolores compartidos, gracias por soportar el vaivén de los años. Y por las fiestas que han pasado y que aun no pasan.

Gracias Jaquelin por convertirte en mi amiga, por compartir locuras, gracias por crecer juntas en un ambiente algo complicado. Gracias por los cigarros. Jack gracias por tu carácter bonachón y alegre, pero de igual forma te agradezco los regaños y los malos momentos compartidos.

A Fabiola: muchísimas gracias por las interminables pláticas, donde tratar de entender la vida, nuestra vida, se ha convertido en una irremediable duda. Gracias por confiarme tus ideas. Gracias Faa por la compañía, por la amistad, por convertirte en otra compañera de batallas.

Alice, muchísimas gracias por mostrarme el hermoso ser humano que eres, gracias por devolverme la fe, gracias por presentarte en un momento extraño de mi existir, gracias por tu sencillez, por la confianza depositada. Gracias Aliss por transformarte en una persona importante en mi vida.

A ojirdor, gracias por tanto tiempo compartido, por apoyarme y motivarme a crecer. Gracias por todo lo que hiciste y dijiste, pero sobre todo gracias por todo aquello que no hiciste y no dijiste.

Gracias a todas aquellas personas que de algún modo han influido en mi vida académica y sobre todo en la personal.

Gracias a ese extraño, por rescatarme, por permitirme amar, gracias por entrar en mi vida de a poco, por convertirte en fe, gracias por toda la bonanza que me das. Y por ser caterpillar.

# Índice

Resumen.....	3
1. Introducción. ....	5
1.1 Levaduras.....	5
1.1.1 Ciclo de vida.....	5
1.2 Sistema de respuesta a feromonas de apareamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
1.3 Receptores acoplados a proteínas G (RAPGs) involucrados en la respuesta a feromonas de.....	9
1.3.1 Ste2p de <i>S. cerevisiae</i> .....	11
1.4 <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	12
1.4.1 Sistema de respuesta a feromona de <i>K. lactis</i> .....	13
2. Justificación.....	15
3. Objetivos.....	16
4. Materiales y métodos.....	17
4.1 Cepas y plásmidos.....	17
4.2 Medios de cultivo para <i>Kluyveromyces lactis</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	17
4.3 Clonación del gen <i>KISTE2</i> .....	18
4.3.1 Amplificación por PCR.....	18
4.3.2 Clonación del gen <i>KISTE2</i> en un vector para productos de PCR (pCR4-TOPO).....	18
4.3.3 Transformación de <i>E. coli</i> .....	19
4.3.4 Purificación de pCR4TOPO- <i>KISTE2</i> .....	19

4.4 Interrupción gen <i>KISTE2</i> .....	19
4.4.1 Subclonación en el vector de integración Ylp352.....	19
4.4.2 Amplificación por PCR de la construcción Ylp352- <i>KISTE2</i> .....	20
4.4.3 Transformación de <i>K. lactis</i> .....	21
4.4.4 Selección de las clonas mutantes mediante Southern blot.....	21
4.5 Ensayos de apareamiento.....	22
4.6 Expresión del gen <i>KISTE2</i> .....	23
5. Resultados.....	24
5.1 Clonación del gen <i>KISTE2</i> .....	24
5.2 Análisis de la secuencia de <i>KISTE2</i> .....	25
5.3 Interrupción del gen <i>KISTE2</i> .....	28
5.4 Fenotipo de la mutante $\Delta Kiste2$ .....	31
5.5 Expresión del gen <i>KISTE2</i> .....	32
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	38
8. Perspectivas.....	39
9. Bibliografía.....	40

## Resumen

La respuesta a feromonas de apareamiento para la conjugación de las levaduras, es un sistema de señalización que incluye receptores acoplados a proteínas G (RAPGs). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* estos receptores son; ScSte3p (receptor para la feromona  $\alpha$ ) y ScSte2p (receptor para la feromona  $\alpha$ ), ambos son del tipo sexo específico, es decir, se expresan diferencialmente en los tipos celulares. Mientras que el receptor ScSte3p se expresa únicamente en las células *MAT $\alpha$*  el receptor ScSte2p lo hace en las células *MAT $a$* .

En el presente trabajo se describe la caracterización de uno de los receptores acoplados a proteínas G (KlSte2p) implicado en la respuesta a feromonas de la levadura *Kluyveromyces lactis*. El sistema de respuesta a feromonas de esta levadura presenta diferencias importantes respecto al de *S. cerevisiae* que lo hacen un poco más semejante al de algunos vertebrados. Estas diferencias involucran la función de las subunidades de la proteína G sobre la propagación del estímulo. Esto último hace más interesante entender el funcionamiento de los receptores acoplados a proteínas G en esta levadura.

El gen *KISTE2* tiene un marco abierto de lectura de 1370 pares de bases. La secuencia de aminoácidos de dicho gen presenta un porcentaje de identidad del 48% respecto a la secuencia de aminoácidos del gen de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScSTE2*). La predicción de cruces transmembranales de KlSte2p presenta una topología característica de los receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranales, unidos por seis asas, 3 externas y 3 internas. En dicha estructura encontramos también la conservación de ciertos residuos de aminoácidos, algunos involucrados en la activación del receptor (como la prolina 258 y la serina 259, localizados en el sexto cruce transmembranal). Otros son residuos importantes en la regulación del receptor (residuos de serina en el extremo carboxilo y un residuo de lisina en el mismo extremo). El alineamiento permite reconocer las áreas más conservadas, como los cruces transmembranales y las regiones menos conservadas entre las dos proteínas. La región menos conservada es la del extremo carboxilo terminal, la cual está involucrada en la interacción con la proteína G y en la regulación de los componentes río abajo de la cascada.

Por medio de ensayos de apareamiento hechos con mutantes *null* para ambos tipos sexuales (*MATa* y *MATα*), se observó que las células *MATα* fueron incapaces de aparearse, mientras que las *MATa* lo hicieron normalmente. Indicando que el gen *KISTE2* es esencial para las células *MATα* en el sistema de respuesta a feromonas de *K. lactis*. Esto se comprobó analizando la expresión de *KISte2p*. Se observó que sólo las células *MATα* lo expresan. Con esto se puede decir que el gen *KISTE2* codifica para un receptor acoplado a proteína G y que su participación en la respuesta a feromonas de *K. lactis* es esencial en las células *MATα*, por lo que seguramente codifica para el receptor de la feromona **a**.

# 1. Introducción.

## 1.1 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que desde hace años han sido objeto de estudio, debido en gran medida a la importancia económica que representan. Estos hongos están involucrados en procesos fermentativos asociados al progreso y bienestar de la humanidad, de hecho el término levadura proviene muy probablemente del producto de la fermentación, es decir de levantar (*latín levare*= levantar) (Kocková, 1990).

La levadura más estudiada y la más empleada como modelo biológico es la levadura del pan o de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae*, la cual pertenece a la clase de los hemiascomycetos, su principal hábitat natural es la superficie de la fruta. Presenta un genoma relativamente pequeño (16 cromosomas en células haploides, 12.1 Mb) lo que permite su fácil manipulación y análisis. De hecho *S. cerevisiae* fue el primer eucarionte cuyo genoma fue secuenciado en su totalidad. Esta levadura presenta además un ciclo de vida con dos fases, una sexual y una asexual, que entre otras cosas permite abordar estudios con herramientas que provee la genética formal (Dickinson, 2004).

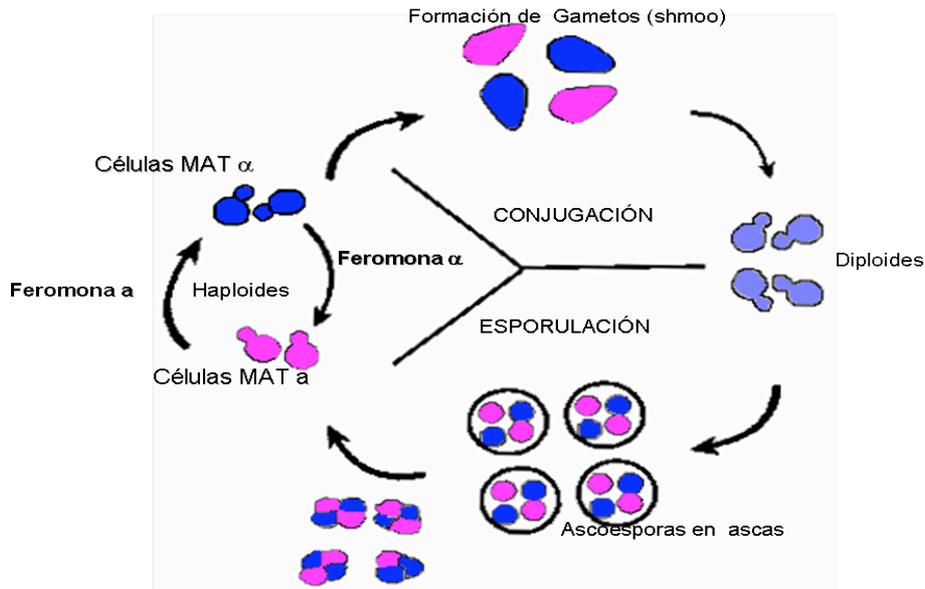
Pese a que *S. cerevisiae* es uno de los organismos eucariontes más estudiados, y por lo tanto el modelo eucarionte más empleado, existen otros eucariontes inferiores que se han comenzado a estudiar, ampliando la posibilidad de entender e interpretar diversos procesos fisiológicos.

### 1.1.1 Ciclo de vida de las levaduras

En estado diploide las células pueden entrar en la etapa de esporulación en la cual se dividen por meiosis, originando cuatro esporas haploides, las cuales están inicialmente contenidas en un saco llamado asca, de donde son liberadas para llevar a cabo el proceso de germinación. La germinación de estas esporas dan lugar a cuatro células haploides: dos del tipo sexual **a** y dos del tipo sexual  $\alpha$  (Fig.1) (Kocková, 1990; Jones, 1992; Nasim, 1989; Dickinson, 2004).

En *S. cerevisiae* el tipo sexual al que cada célula haploide pertenece está determinado por la información contenida en el locus *MAT*, cuya expresión es diferencial. En las células del tipo *MATa* se expresan, por ejemplo: *ScMFa1* que es el gen para la feromona **a** y *ScSTE2* que es el gen del receptor para la feromona  $\alpha$ , mientras que se mantienen reprimidos los genes específicos de las células *MAT $\alpha$* . Por otro lado en las células del tipo *MAT $\alpha$*  expresan entre otros, el gen para la feromona  $\alpha$  (*ScMF $\alpha$ 1*) y el gen del receptor para la feromona **a** (*ScSTE3*) (Haber, 1998).

Cuando células de ambos sexos se encuentran y se reconocen se da la conjugación, donde una célula *MATa* se aparee con una célula del tipo *MAT $\alpha$*  (Fig.1). El apareamiento se inicia cuando una célula haploide reconoce al factor sexual (feromona) secretado por una célula del sexo contrario. Es decir cuando la feromona **a** secretada por una célula *MATa* es reconocida por un receptor específico localizado en la membrana de una célula *MAT $\alpha$*  y a su vez la feromona  $\alpha$  proveniente de una célula *MAT $\alpha$*  es identificada por su receptor membranal en una célula *MATa*. Este reconocimiento de feromonas sexuales en cada célula, activa el sistema de transducción de señales en respuesta a feromonas de apareamiento. Esta cascada de señales conlleva a la formación del gameto, que es una célula alargada en forma de pera, conocida con el nombre de shmoo (Fig.1). Por último las células en forma de pera se fusionan y dan lugar a una célula diploide completando el ciclo (Kocková, 1990; Jones, 1992; Nasim, 1989; Dickinson, 2004).



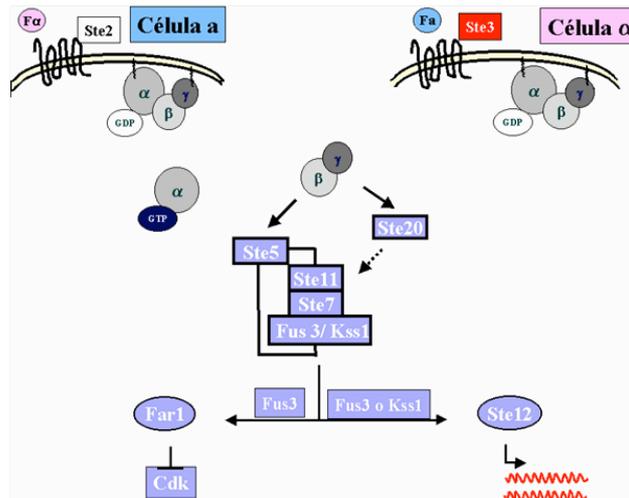
**Fig.1** Ciclo de vida de una levadura: en la parte izquierda se muestran los dos tipos celulares haploides ( $MATa$  y  $MAT\alpha$ ), los cuales en ausencia de feromona se reproducen por gemación, pero en presencia de la feromona del sexo contrario llevan a cabo la formación de gametos (shmoo). Estos gametos se fusionan dando lugar a las células diploides (conjugación), que también pueden reproducirse de forma asexual mediante gemación o pueden llevar a cabo el proceso de esporulación, en donde se forman las ascas que contienen a las ascosporas, que al germinar dan lugar a dos células  $MATa$  y dos  $MAT\alpha$ , y por lo tanto se reinicia el ciclo.

## 1.2 Sistema de respuesta a feromonas de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Los sistemas de señalización mejor caracterizados son aquellos en los que participan receptores transmembranales acoplados a proteínas G, que están involucrados en la respuesta a diversos estímulos (en eucariontes superiores, por ejemplo: luz, olores, sabores, hormonas, etc, y en eucariontes más simples, por ejemplo: feromonas y sales, entre otros). Dentro de estos sistemas se encuentra el de respuesta a feromonas de apareamiento. Éste sistema, así como los componentes que participan en él, están bien caracterizados en esta levadura (Dohlman, 2002).

La cascada se activa cuando la feromona secretada por uno de los tipos sexuales es reconocida por la célula del sexo contrario. En *S. cerevisiae* la feromona **a** es reconocida por el receptor ScSte3p mientras que la feromona  **$\alpha$**  es reconocida por el receptor ScSte2p. Dichos receptores pertenecen a una gran familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Dohlman, 2002).

La unión de la feromona al receptor ocasiona un cambio conformacional, que afecta la interacción del receptor con la proteína G heterotrimérica. Los componentes de este heterotrímero son la subunidad  $G\alpha$ , codificada por el gen *GPA1*, y el dímero formado por las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , codificadas por los genes *STE4* y *STE18*, respectivamente. En ausencia de feromona la subunidad  $G\alpha$  que tiene unida una molécula de GDP, se encuentra asociada al dímero  $G\beta\gamma$ , cuando el receptor es activado (unión de la feromona a su receptor) se da un intercambio de GDP por GTP que ocasiona que la subunidad  $G\alpha$  se disocie de el dímero  $G\beta\gamma$ . El dímero disociado transmite la señal a sus efectores, entre ellos está Cdc24p (que es un intercambiador de nucleótidos), que actúa sobre Cdc42p (GTPasa monomérica), lo que produce un crecimiento polarizado de la célula. Los otros efectores del dímero son la cinasa Ste20p y la proteína de andamiaje Ste5p, ambas involucradas en la transmisión de la señal mediante la fosforilación de la MAPcinasa cinasa cinasa (MAPKKK) Ste11p, la cual fosforila a Ste7p (MAPKK) que a su vez actúa sobre Fus3p (MAPK). Esta última cinasa activa el factor transcripcional Ste12p, el cual reconoce secuencias PRE (por las siglas en inglés, "Pheromone Response Element") presentes en la región del promotor de los genes necesarios para el apareamiento de las células (Fig.2) (Dohlman, 2002).



**Fig. 2** Sistema de respuesta a feromona de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se esquematiza ambos tipos celulares con sus receptores respectivos, así como la feromona que reconocen. También se representa la disociación de la proteína G. El dímero Gβγ activa a Ste5p y a Ste20p, para que la señal sea transmitida por la cascada de MAPquinasas: Ste11p (MAPKKK), Ste7p (MAPKK), Fus3p (MAPK). Esta última, entre otras cosas, activa a Ste12p, que es un factor transcripcional.

### 1.3 Receptores acoplados a proteínas G (RAPGs) involucrados en la respuesta a feromonas

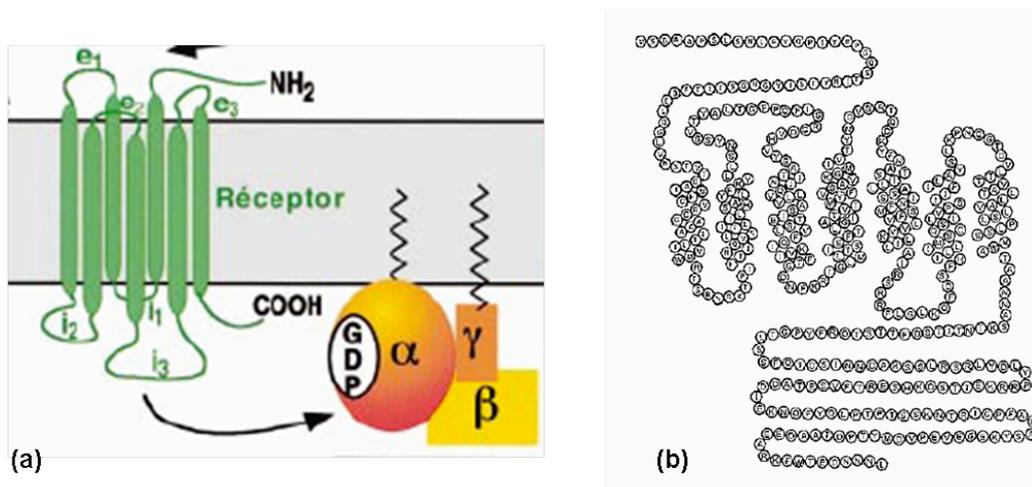
La familia de receptores acoplados a proteínas G (RAPGs), a la cual pertenecen ScSte2p y ScSte3p, comprenden un grupo de más de 300 miembros conocidos a nivel de secuencia primaria, involucrados en una serie de procesos relacionados con la adaptación de los organismos (Jiménez, 2003).

Todos los receptores acoplados a proteínas G presentan la misma topología, tienen siete segmentos transmembranales (hélices α, que van de 20 a 25 residuos de aminoácidos) unidos por tres asas extracelulares y tres intracelulares alternantes (las cuales varían de 10 a 40 residuos de extensión). El extremo amino terminal es extracelular (va de 12 a 359 residuos de aminoácidos), mientras que el extremo carboxilo terminal es intracelular (de 7 a 595 residuos) (Fig. 3) (Bockaert, 2001; Dohlman and Thorner, 2001; Strader *et al.*, 1994).

Dentro de los RAPGs mejor caracterizados se encuentra la rodopsina, que es el receptor encargado de la fototransducción en la retina de vertebrados, y el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, cuyo ligando es la epinefrina y la norepinefrina. Estudios en estos receptores, han dejado ver que en su activación participan principalmente el primer segmento transmembranal, la tercera asa intracelular y la sexta hélice. En el caso de las hélices se ha observado que presentan un giro conformacional en respuesta a la unión del ligando, ocasionando que la tercera asa intracelular, que es la que participa en la unión con la proteína G, cambie su conformación provocando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ . La sexta hélice transmembranal contiene residuos de prolina y serina que son esenciales para la actividad de este receptor (Konopka *et al.*, 1996). En el acoplamiento con la proteína G se ha visto que también están involucradas las asas intracelulares uno y dos, así como el extremo carboxilo y las hélices transmembranales V, VI y VII (Dohlman, *et al.*, 1991; Perce, *et al.*, 2002; Bockaert, 2001).

Se ha observado que la estabilidad de algunos de estos receptores está dada por la presencia de residuos de cisteína (localizados en la primer y la segunda asa extracelular) que forman un enlace disulfuro (Bockaert., 2001; Watson, *et al.*, 1994). Otros sitios importantes son aquellos involucrados en el proceso de anclaje a la membrana de dichos receptores, como lo son el residuo de cisteína localizado en el extremo carboxilo terminal involucrado en la palmitoilación y la secuencia consenso de glicosilación localizada en el extremo amino terminal (Strader, *et al.*, 1994).

Los RAPGs presentan además sitios potenciales de fosforilación necesarios para el proceso de desensibilización. Dicho proceso consiste en el desacoplamiento del receptor con la proteína G por fosforilación mediada por cinasas de proteínas dependientes de segundos mensajeros o cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Esta desensibilización se da en segundos o minutos después de que el receptor es estimulado por su ligando, y funciona como un proceso de regulación de dichos receptores. Entre los residuos importantes en el proceso de regulación están los últimos residuos de serina y treonina en el extremo carboxilo y un residuo de lisina (338) responsable de la ubiquitinación (Hicke *et al.*, 1998).



**Fig. 3** Esquema de receptores acoplados a proteínas G (RAG). **(a)** estructura general de los RAGs, siete cruces transmembranales (TMI, II, III, VI, V, VI, VII), las tres asas intracelulares ( $i_1$ ,  $i_2$ ,  $i_3$ ), las extracelulares ( $e_1$ ,  $e_2$ ,  $e_3$ ) y el extremo carboxilo interno, así como el extremo amino externo, acoplados a la proteína G heterotrimérica. **(b)** Receptor para la feromona  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* (secuencia de aminoácidos).

### 1.3.1 Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae*.

El receptor Ste2p (receptor para la feromona  $\alpha$ ) de *Saccharomyces cerevisiae* es una proteína de 431 aminoácidos, que además de ser parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G (RAGs), es una proteína sexo específica, ya que sólo se encuentra en las células del tipo *MAT a*.

En este receptor el extremo carboxilo terminal tiene una extensión de 130 residuos de aminoácidos, dentro de los cuales se encuentran los de serina y treonina que participan en el proceso de desensibilización (Dosil, *et al* 2000). Además ha visto también que éste extremo tiene un papel importante en el acoplamiento y activación de la proteína G, ya que interactúa con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de dicha proteína (Durán-Avelar, *et al*, 2001). La tercera asa intracelular esta también involucrada en el acoplamiento y en la activación de la

proteína G (Bukusoglu and Jennes, 1996). En cuanto a la unión del ligando al receptor se ha observado que las asas extracelulares y la cara externa de los cruces transmembranales forman un dominio común para dicha unión (fig.3) (Dasil, *et al.*, 1998).

#### **1.4 *Kluyveromyces lactis***

*Kluyveromyces lactis* es una levadura hemiascomyceta que presenta seis cromosomas que miden de 1 a 3 Mb, el tamaño total del genoma es de 10 Mb aproximadamente. *K. lactis* es una levadura “petite-negativa”, el término petit se refiere a aquellas levaduras, que al presentar una mutación mitocondrial requieren de un sustrato fermentable para poder crecer, y las colonias son mucho más pequeñas. Esta mutación mitocondrial es letal, es decir, las levaduras petit negativas son incapaces de crecer en un medio fermentable, y en consecuencia son consideradas aerobias estrictas (Schaffrath and Breunig, 2000; Brunner, 1981). Esta levadura se aísla principalmente de productos lácteos, donde la principal fuente de carbono es la lactosa. *K. lactis* es una de las pocas levaduras que pueden utilizar la lactosa como única fuente de carbono, convirtiéndola en ácido láctico (Dickson and Schweizer, 2004; Schaffrath and Breunig K., 2000). Esta característica ha despertado el interés por este organismo en la industria de los productos lácteos.

Con el avance de técnicas moleculares se ha demostrado que *K. lactis* es bastante manipulable en el laboratorio, esta levadura se ha empleado para la obtención de  $\beta$ -galactosidasa y de algunas proteínas heterólogas como la proquimosina de vaca, la interleucina-1 $\gamma$  humana y la albúmina humana (Schaffrath and Breunig, 2000).

A la fecha *K. lactis* se ha vuelto un buen modelo biológico para estudiar aspectos fisiológicos en levaduras no convencionales. En nuestro laboratorio estamos interesados en describir su sistema de respuesta a feromonas.

#### 1.4.1 Sistema de respuesta a feromona de *K. lactis*.

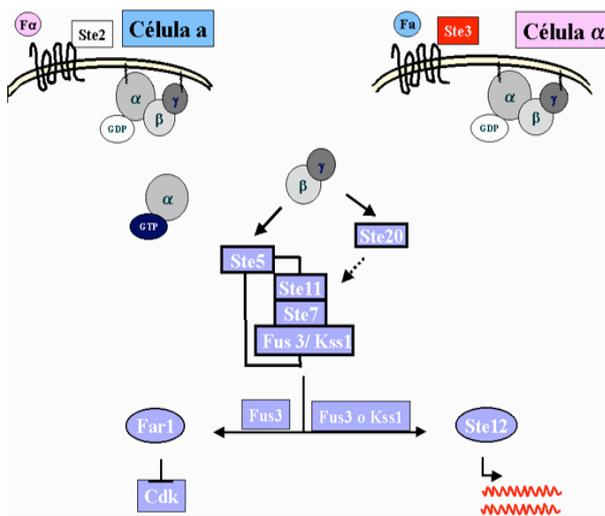
Al igual que *S. cerevisiae*, *K. lactis* presenta dos tipos celulares ( $\mathbf{a}$  y  $\alpha$ ), los cuales deben reconocerse y fusionarse para formar células diploides y poder continuar con su ciclo de vida, por lo que es de esperarse que el sistema de respuesta a feromonas sea muy similar entre ambas levaduras. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio nos han permitido identificar algunas diferencias importantes entre estos dos sistemas.

Dentro de las proteínas estudiadas en nuestro grupo, están la subunidad  $G\alpha$  (gen *KIGPA1*) y la subunidad  $G\beta$  (gen *KISTE4*), de la proteína G heterotrimérica. En *S. cerevisiae* la interrupción de *ScGPA1* ocasiona que las células detengan su división en la fase  $G_1$ , sugiriendo que esta subunidad actúa como un regulador negativo de las subunidades  $G\beta\gamma$ . Mientras que mutantes  $\Delta Scste4$  son incapaces de aparearse, indicando que esta subunidad es esencial para la respuesta a feromonas. En *K. lactis* una mutante  $\Delta Klgpa1$  es parcialmente estéril, por su parte una mutante  $\Delta Kiste4$  es estéril, esto indica que ambas proteínas actúan como reguladores positivos de la vía, es decir, son esenciales para la transmisión de la señal (Saviñon *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2005) (Fig. 4).

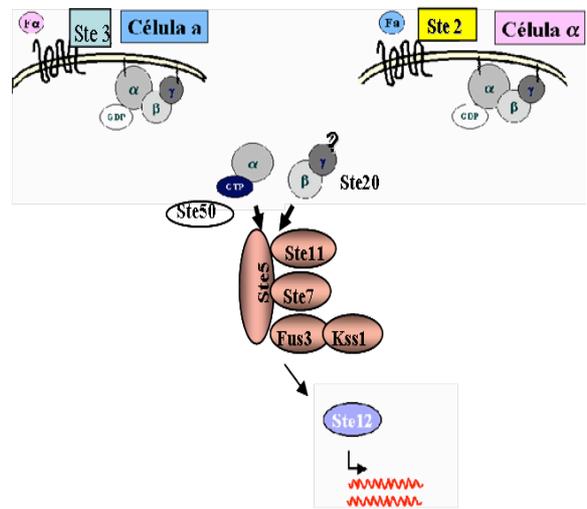
Otra diferencia entre ambos sistemas de transducción está en la subunidad  $G\gamma$ ; mutantes  $\Delta Scste18$  en *S. cerevisiae* son estériles lo que indica que esta subunidad es esencial para el apareamiento, mientras que en *K. lactis* mutantes  $\Delta Kiste18$  son parcialmente estériles, es decir, la subunidad  $G\gamma$  no parece ser esencial en el apareamiento (Fig. 4).

Algunas otras proteínas identificadas en *K. lactis* que presentan fenotipos similares a los descritos para *S. cerevisiae* son: *KISte5p* que es una proteína de andamiaje, las cinasas *KISte20p*, *KISte11p*, *KISte7p*, el factor transcripcional *Ste12p*, el receptor para la feromona  $\alpha$  (*KISte3p*), todas estas son esenciales para el apareamiento y la cinasa *KIFus3p* que no es esencial debido a la presencia de la cinasa *KIKss1p* que desempeña la misma función que *Fus3p* (Fig. 4) (Coria *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se describe la caracterización de otro posible componente de este sistema, el gen *KISTE2* homólogo al gen *ScSTE2* que codifica para el receptor de la feromona  $\alpha$  en *S. cerevisiae*.



Respuesta a feromona en *S. cerevisiae*



Respuesta a feromona en *K. lactis*

**Fig. 4** Representación de los sistemas de respuesta a feromonas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*. En ambos casos se representa los dos tipos celulares con su receptor transmembranar así como la feromona a la cual reconocen. Se puede observar las diferencias entre ambos sistemas sobre todo en la activación de la vía mediante las distintas subunidades de la proteína G, en *S. cerevisiae* la subunidad  $G\alpha$  no participa en la activación de la vía mientras que en *K. lactis* tanto la subunidad  $G\alpha$  y la  $G\beta$  activan la vía. También se puede observar las demás proteínas identificadas que participan en ambas vías (Ste20p, Ste5p, Ste11p, Ste7p, Ste3p, Fus3p, Kss1p, Ste12p, entre otras).

## 2. Justificación

Las células han desarrollado diversos mecanismos de señalización que les permiten llevar a cabo un sin fin de funciones como la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la coordinación entre tejidos, la percepción de su entorno, etc. En su gran mayoría estos sistemas de transducción de señales involucran a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (RAPGs), que son los encargados de recibir el mensaje específico y transmitirlo al interior celular. La importancia de entender cómo es que estos receptores están funcionando radica en que son componentes clave en multitud de funciones vitales, por lo tanto su mal funcionamiento está asociado a muchas patologías.

El estudio de los receptores en *Kluyveromyces lactis* nos permitirá profundizar en los mecanismos del acoplamiento entre estas proteínas y la proteína G heterotrimérica, cuyo papel en la vía tiene características, tales como la actividad positiva de la subunidad  $G\alpha$  y el carácter despreciable de la subunidad  $G\gamma$ .

### **3. Objetivo.**

Estudiar el papel del gen KISTE2 en el sistema de respuesta a feromonas de *Kluyveromyces lactis*, mediante su clonación, su caracterización topológica, su inactivación y el estudio de su expresión en células haploides de ambos sexos.

## 4. Materiales y métodos.

### 4.1 Cepas y plásmidos.

Las cepas empleadas en este trabajo fueron:

- Levaduras: *Kluyveromyces lactis*;
  - Cepa 155. MAT $\alpha$ ; ade2, his3, ura3
  
  - Cepa 12/8. MAT $\alpha$ ; lysA, argA, ura3
- Bacterias: *Escherichia coli*;
  - Cepa DH5 $\alpha$ . supE44  $\Delta$ lacU169 (o80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-relA1

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- pCR4-TOPO. Plásmido de clonación para productos de la PCR, el cual posee un origen de replicación para bacterias. Presenta los genes de resistencia a Kanamicina y a Ampicilina.
- YIp352. Plásmido de integración, no tiene origen de replicación para levaduras. Contiene el gen URA3, el cual se utilizó como marcador de auxotrofia, posee un sitio de clonación múltiple, tiene origen de replicación para bacterias y el gen de resistencia a Ampicilina.

### 4.2 Medios de cultivo para *Kluyveromyces lactis* y *Escherichia coli*.

*Kluyveromyces lactis*.

Se empleó el medio rico YPD, el cual contiene extracto de levadura al 1%, bacto-pectona al 2% y glucosa al 2%. El medio mínimo SD, tiene base nitrogenada al 0.67% sin aminoácidos (DIFCO) y glucosa al 2%, además fue

suplementado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Para los medio sólidos se agregó agar al 2%.

#### *Escherichia coli.*

Se utilizó medio Luria Bertani (LB) con 75µg/ml de ampicilina (Sambrook, et al., 1989).

### **4.3 Clonación del gen *KISTE2*.**

#### **4.3.1 Amplificación por PCR.**

A partir de la secuencia de la región codificante del gen *KISTE2* reportada en la base de datos de Génolevures (Souciet et al., 2005, <http://cbl.labri.fr/Genolevures/elt/KLLa>) se diseñaron un par de oligonucleótidos: uno en la posición -29 -2 (5'TTTTGAGAATTCGCATTA ACTTATTTAA3') con una Tm de 68°C, y el otro en la posición +1317 +1333 (5'TGGTACTCTGTCCAAG3') con una Tm de 50°C. Estos oligonucleótidos funcionaron como iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como molde se utilizó ADN genómico de *K. lactis* purificado de acuerdo al protocolo descrito por Hoffman et al. (1987). La reacción se hizo con Taq polimerasa I (Invitrogen), y se realizó una curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> (de 1mM a 3mM), en todas las concentraciones se obtuvo amplificado.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 5min; 40 ciclos de 94 °C por 45 seg, 58 °C por 45 seg y 72 °C por 2 min, y por último una elongación final de 10 min a 72°C.

#### **4.3.2 Clonación del gen *KISTE2* en un vector para productos de PCR (pCR4-TOPO).**

Los productos de PCR se purificaron siguiendo las indicaciones del Kit GeneClean<sup>®</sup> de Invitrogen. El fragmento obtenido se clonó en el plásmido pCR4-TOPO según las especificaciones del Kit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> de Invitrogen.

### **4.3.3 Transformación de *E. coli*.**

Para la transformación de *E. coli* se prepararon células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  según el protocolo de transformación de alta eficiencia de Inoue et al., (1990). Estas células competentes se transformaron por choque térmico (Sambrock et al., 1989).

### **4.3.4 Purificación de pCR4TOPO-KISTE2.**

Se realizó la extracción de la construcción pCR4TOPO-KISTE2, siguiendo el procedimiento para miniprep QIAprep<sup>®</sup> de QUIAGEN.

Las muestras obtenidas fueron cuantificadas por densidad óptica en un espectrofotometro (BEKMAN DU<sup>®</sup> 640) leyendo a 260nm y a 280nm, utilizando como blanco agua desionizada estéril. Los plásmidos se analizaron mediante digestiones con endonucleasas de restricción. Las enzimas empleadas fueron *EcoR* I y *Hind* III.

Esta construcción fue empleada para secuenciar el gen *KISTE2* en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se realizó un alineamiento del gen *KISTE2* y del gen ScSTE2 para determinar su identidad, además se realizaron predicciones de cruces transmembranales de la secuencia de aminoácidos de dicho gen empleando los programas SOSUI (Hirokawa, 1998), ProteinPredict (Rost,1996), y TMpred (Hofmann, 1993).

## **4.4 Interrupción del gen KISTE2**

### **4.4.1 Subclonación en el vector de integración Ylp352.**

Para la subclonación del gen *KISTE2* en el vector de integración Ylp352, se obtuvo dicho gen a partir de la construcción pCR4TOPO-KISTE2 mediante digestiones con la endonucleasa *EcoRI*. El plásmido Ylp352 también fue digerido con la misma enzima de restricción.

Para la reacción de ligación del gen *KISTE2* y el plásmido YIP352 se empleó la enzima T4 ADN ligasa de Roche siguiendo las especificaciones del proveedor.

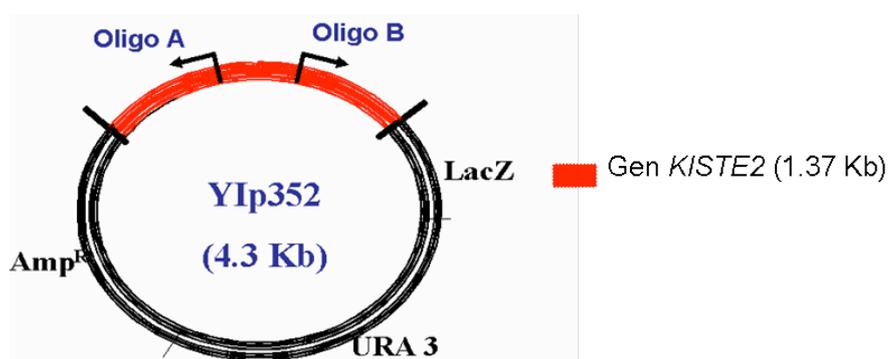
El producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 $\alpha$  de *E. coli*. La extracción del plásmido se realizó con el kit para miniprep QIAprep<sup>®</sup> de QUIAGEN, y fue analizado mediante digestiones con las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *HincII* y *HindIII*.

#### 4.4.2 Amplificación por PCR de la construcción YIp352-KISTE2

Para llevar a cabo la interrupción del gen KISTE2 fue necesario realizar una PCR para obtener un producto lineal que contuviera el plásmido YIp352 con un fragmento del gen en cada extremo, para lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos divergentes (fig. 5), uno en la posición +400 +385 (5' TTAGAGTCACGGCACC3', oligo A) y el otro en la posición +905 +920 (5' CACCAAGTGCCAGTAC3', oligo B), ambos con una T<sub>m</sub> de 50° C. El ADN molde para la PCR fue la construcción YIp352-KISTE2.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 5min; 45 ciclos de 94 °C por 45 seg, 47 °C por 45 seg y 72 °C por 5 min, y finalmente una elongación final de 10 min a 72°C. Se empleó la enzima Taq polimerasa I de Invitrogen, relajándose una curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> (de 1 mM a 4mM), la concentración de 1mM fue la que permitió la amplificación del producto esperado.

Los productos de PCR fueron purificados según las especificaciones del kit GeneClean<sup>®</sup> de Invitrogen.



**Fig 5.** Representación de la construcción utilizada para la interrupción del gen *KISTE2*. En la representación, se muestran las características principales del plásmido, también se pueden observar las posiciones aproximadas de los oligos empleados para la amplificación de la construcción.

#### **4.4.3 Transformación de *Kluyveromyces lactis*.**

El producto obtenido de la PCR descrita anteriormente se empleó para transformar las cepas *MATa* y *MAT $\alpha$*  de la levadura *Kluyveromyces lactis*, para que mediante recombinación homóloga produjera la interrupción del gen silvestre. El método utilizado para la transformación fue el descrito por Adams *et al.*, 1997, el cual está basado en la adición de acetato de Litio (LiOAc), polietilenglicol (PEG) y dimetilsulfóxido (DMSO).

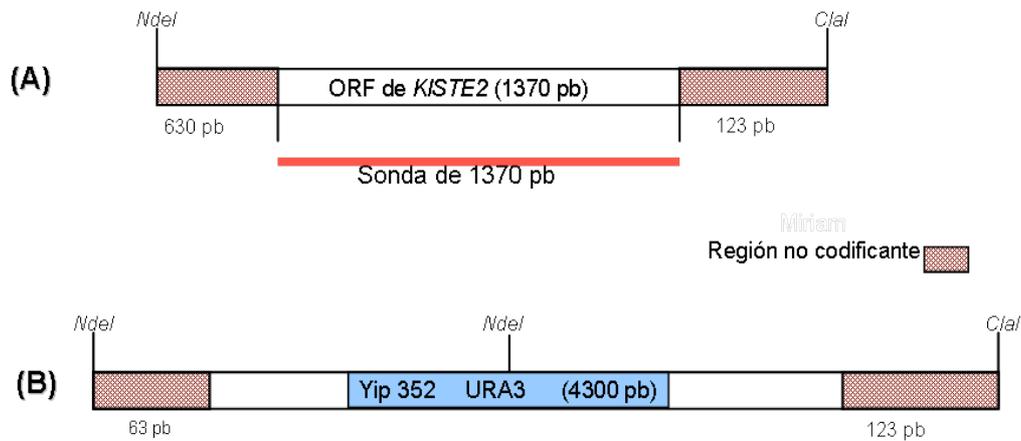
Las levaduras transformadas fueron seleccionadas en medio mínimo SD con todos los aminoácidos y sin uracilo.

#### **4.4.4. Selección de las clonas mutantes mediante Southern blot.**

Para la selección de las clonas mutantes, se realizó la extracción de ADN cromosomal tanto de las transformantes obtenidas para ambos sexos, como de las cepas silvestres (*MATa* y *MAT $\alpha$* ) siguiendo la técnica descrita por Hoffman y Winston, 1987.

El ADN cromosomal se digirió con las enzimas de restricción *Cla* I y *Nde* I (Fig.6). Estas muestras se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el gel con las muestras se desnaturalizó en una solución de NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 M, para luego ser neutralizado en una solución de TRIS 1M y NaCl 1.5 M.

El ADN contenido en el gel se transfirió a una membrana de nylon por capilaridad mediante una solución 6X de SSC (0.15 M NaCl y 0.015 M Citrato de Sodio). La membrana se hibridó con un fragmento de ADN específico, correspondiente al ORF silvestre del gen *KISTE2* (Fig.6) marcado radiactivamente con [<sup>32</sup>P]  $\alpha$ dCTP, siguiendo las especificaciones del Kit rediprime II<sup>®</sup> de Amersham Pharmacia Biotech. La hibridación se realizó a una temperatura de 55° C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10min. a 60° C cada uno, con una solución de SDS al 0.1% (Dodecil Sulfato de Sodio) y SSC 1X. La membrana se expuso en una pantalla para luego ser revelada en un lector de fosforo radioactivo (typhon).



**Fig. 6.** Representación de la interrupción del gen *KISTE2*; (a) esquema del marco abierto de lectura del gen, la línea roja representa el fragmento empleado como sonda para las hibridaciones tipo Southern y Northern. (b) esquema de la interrupción del gen *KISTE2*; se observa la interrupción del gen con la inserción del marcador *URA3* y del resto del plásmido. En ambos esquemas se muestran los sitios de restricción utilizados para las digestiones en la hibridación tipo Southern.

#### 4.5 Ensayos de apareamiento.

Una vez identificadas las mutantes  $\Delta K/Ste2$ , fue necesario realizar ensayos de apareamiento cualitativos, los cuales consisten en cruzar células haploides de las mutantes (o cepas a probar) con células haploides silvestres del sexo contrario.

El ensayo se realiza sembrando parches de las células haploides mutantes en medio selectivo SD (una caja por sexo), paralelamente se siembra un césped de células de cada sexo (*MATa* y *Mat $\alpha$* ) silvestre en cajas con medio rico YPD. El apareamiento se realiza por replicación en terciopelo en cajas con medio rico YPD, las cuales se dejan 12 horas.

#### **4.6 Expresión del gen *KISTE2*.**

Para analizar la expresión del gen *KISTE2*, se empleó la técnica de hibridación tipo Northern blot. Para lo cual se realizaron extracciones de ARN total de levaduras con fenol caliente, siguiendo la metodología descrita por Ausubel *et al.*, 1996.

Se utilizaron 6µg de RNA de cada muestra para realizar la electroforesis en condiciones desnaturizantes. El gel y el amortiguador para ARN contienen MOPS 10X, formaldehído y H<sub>2</sub>O con DEPC. Para eliminar el exceso de formaldehído el gel se lavó en una solución de SSC 6X durante 3 min.

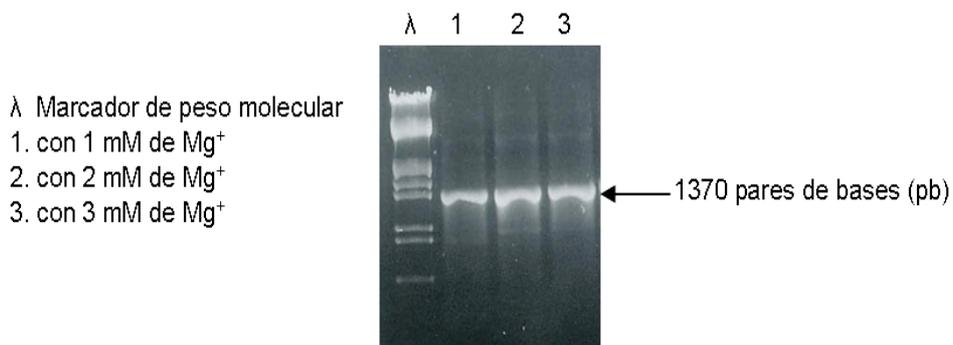
Las muestras fueron transferidas a una membrana de nylon, la cual se hibridó con ADN marcado radiactivamente con [<sup>32</sup>P] αdCTP (Kit rediprime II de Amersham Pharmacia Biotech), esta sonda corresponde al ORF silvestre del gen *KISTE2* (Fig.6).

## 5. Resultados

### 5.1 Clonación del gen *KISTE2*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el gen *STE2* (*ScSTE2*) codifica para el receptor de la feromona  $\alpha$ , este gen tiene un marco abierto de lectura (ORF) de 1296 pares de bases (pb) que se expresa en las células del tipo *MA<sub>t</sub> a*.

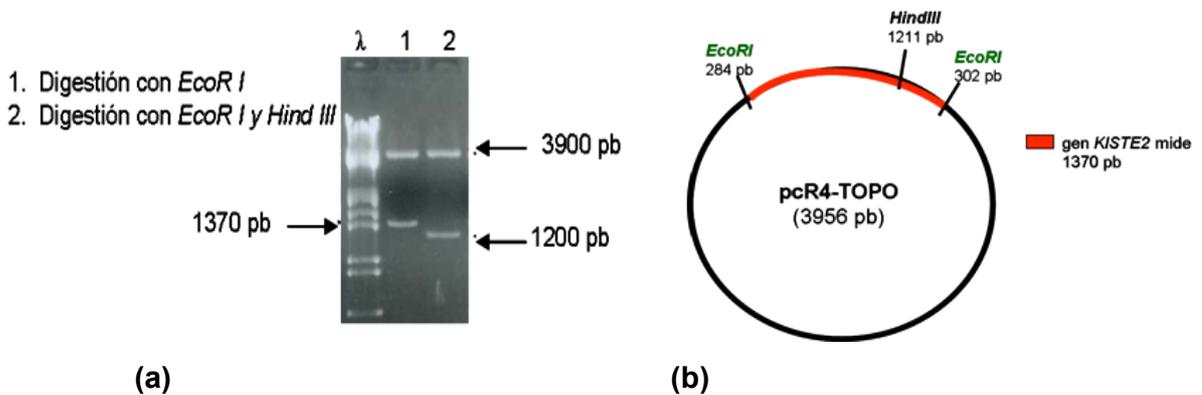
La secuencia reportada en la base de datos de *Kluyveromyces lactis* para el gen *KISTE2* (KLLA0F25102g) (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>) presenta un ORF de 1370 pb (Klla0F:2333488..2334798). A partir de esta secuencia, se diseñaron los oligonucleótidos empleados en la PCR donde se obtuvo un producto del tamaño de dicho gen. En la figura 7 se muestra los productos de PCR obtenidos, en la imagen se observan tres carriles 1, 2 y 3 que corresponden a distintas concentraciones de  $MgCl_2$  empleadas para la PCR. En los tres carriles se observa una sola banda cuyo peso molecular corresponde al ORF del gen *KISTE2* (1370 pb). El producto se clonó en el vector pCR4-TOPO.



**Fig. 7** Fotografía del gel de electroforesis de la PCR realizada para la amplificación del gen *KISTE2*. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular ( $\lambda$ ), los carriles subsiguientes (1, 2 y 3) corresponden a la curva de concentración de  $MgCl_2$  empleada. La flecha indica el producto de PCR esperado así como su peso molecular.

En la figura 8 se puede observar el análisis de restricción una de las clonas pCR4-*KISTE2*. Se realizó una digestión con la enzima *EcoRI* que produce una banda de 1370 pb que corresponde al gen completo *KISTE2* y una banda de 3900 pb correspondiente al vector (pCR4-TOPO). En el carril 2 se emplearon las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. Esta digestión produce dos bandas visibles, una que pertenece al vector (3900 pb) y otra que corresponde a una parte del gen *KISTE2* (1211 pb) debido a la presencia de un sitio *HindIII* interno (Fig. 8 b).

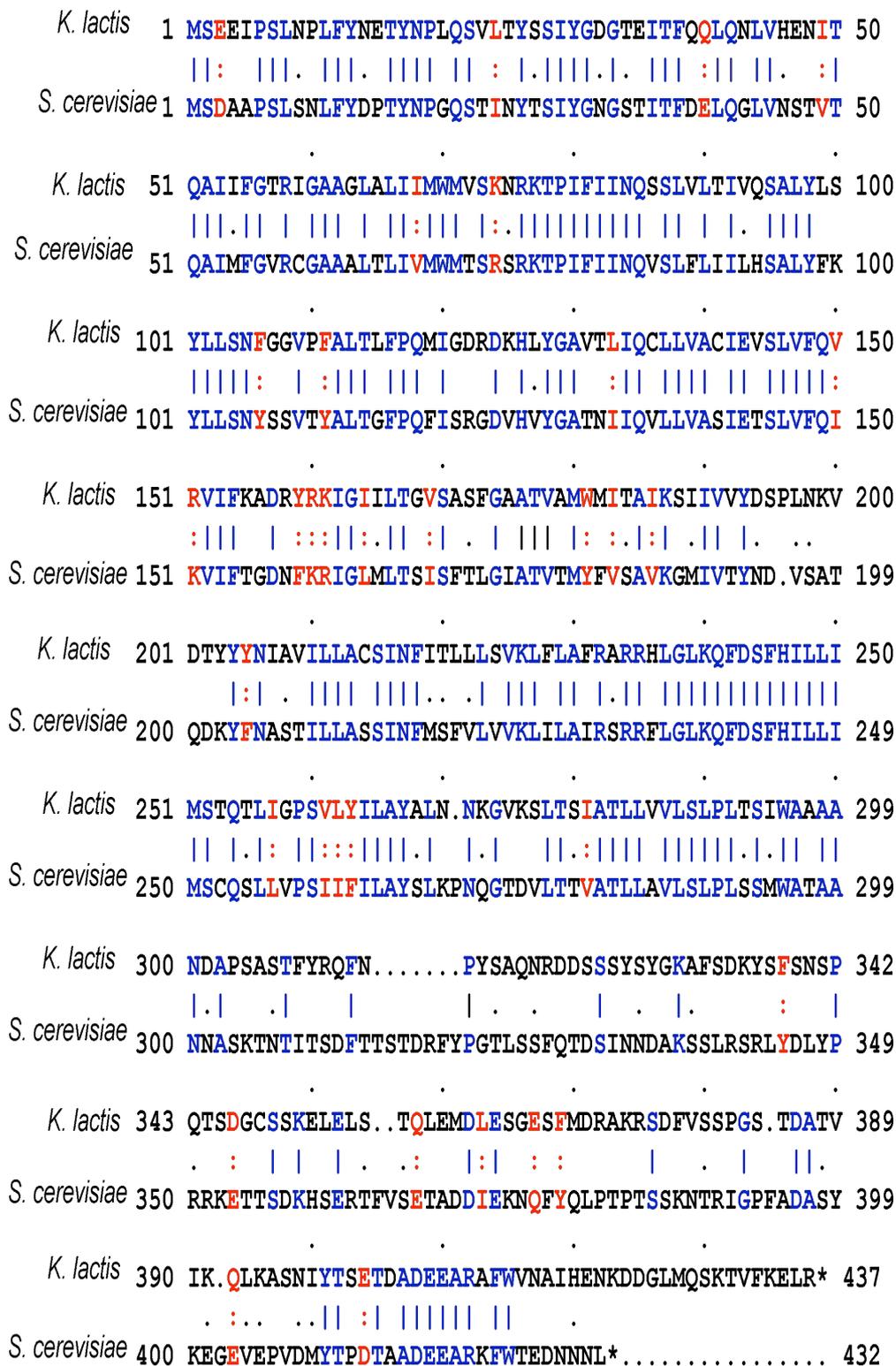
La secuenciación del producto de PCR clonado coincidió con la secuencia del gen *KISTE2* descrita en la base de datos.



**Fig. 8 (a)** Gel de agarosa al 1%. Digestiones con endonucleasas de restricción de la construcción pCR4TOPO-*KISTE2*: en el carril 1 se observa la digestión con *EcoRI*, en donde se obtienen dos fragmentos (3900 pb y 1370 pb). El carril 2 muestra la digestión con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, se pueden ver dos bandas (3900 pb y 1211 pb). **(b)** representación del plásmido pCR4-TOPO con el gen *KISTE2* insertado (rojo), se observan las posiciones de los sitios de restricción empleados.

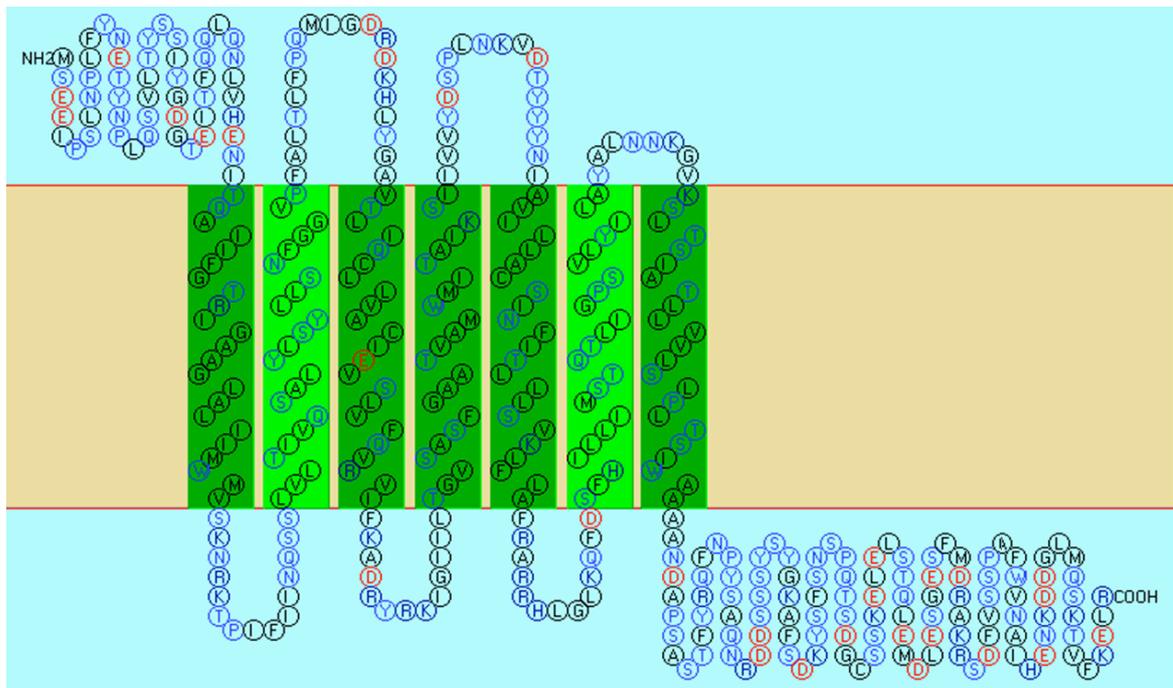
## 5.2 Análisis de la secuencia de *KISTE2*

En la figura 9 se muestra el alineamiento de KIS<sub>te</sub>2p y ScSte2p, el porcentaje de identidad entre ambas secuencias es del 48%. KIS<sub>te</sub>2p se predice con 436 aminoácidos, mientras que ScSte2p es de 431 a.a.



**Fig. 9** Alineamiento de K1Ste2p y ScSte2p. K1Ste2p es de 436 a.a. mientras que ScSTE2 es de 431 a.a. (YFL026W). En azul se muestran los aminoácidos idénticos, mientras que en rojo los aminoácidos similares. El porcentaje de identidad es de 48%, y el porcentaje de similitud es del 65%.

La predicción de cruces transmembranales se realizó con la ayuda de tres programas distintos: SOSUI (Hirokawa, 1998), ProteinPredict (Rost,1996), y TMpred (Hofmann, 1993). Los tres programas predijeron siete cruces transmembranales, tres asas extracelulares, y tres intracelulares, así como el extremo amino terminal en la parte exterior y un extremo carboxilo en la parte interna. La figura 10 muestra una imagen de la predicción de cruces transmembranales de KISTe2p obtenida por el programa SOSUI. En esta imagen se observa la estructura típica de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Los residuos que componen los cruces transmembranales presentan una estructura secundaria de hélices  $\alpha$ .



**Fig. 10** Esquema de la proteína KISTe2p, receptor para la feromona **a** de *Kluyveromyces lactis*. Programa SOSUI (Hirokawa, 1998). Se observa la estructura característica de los RAPGs: siete cruces transmembranales, tres asas intracelulares, tres extracelulares, extremo amino terminal extracelular y el extremo carboxilo terminal intracelular.

Pese a que los tres programas empleados predijeron la misma topología, cabe mencionar que presentaron algunas diferencias en cuanto al número de residuos en cada cruce y por lo tanto en el número de residuos de las asas. En la tabla 1 se encuentran anotadas las predicciones de los cruces transmembranales con los tres programas, así como un promedio del número de residuos por segmento transmembranal.

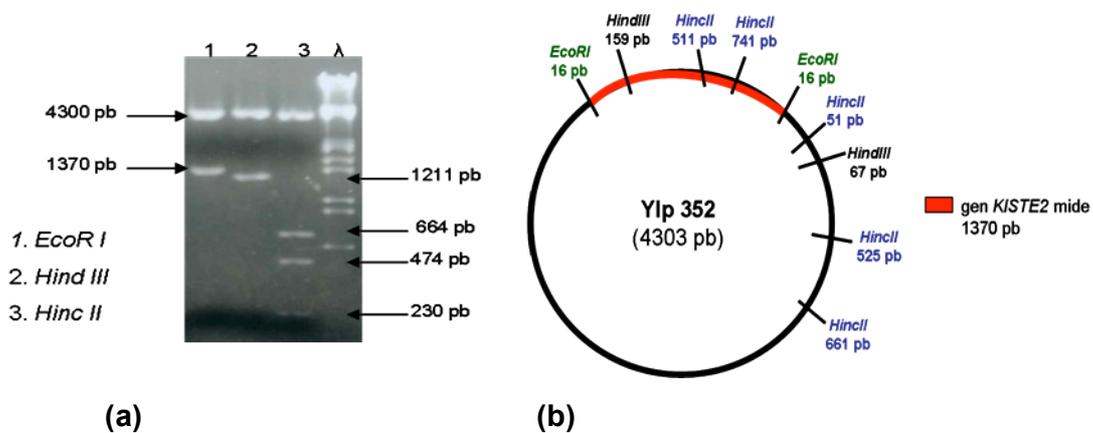
Cruce	SOSUI (Hirokawa, 1998)	ProteinPredict (Rost, 1996)	TMpred (Hofmann, 1993)	Promedio de número de residuos por cruce
1	50-72	53-70	53-73	20
2	88-110	83-104	96-117	22
3	131-153	132-149	132-154	21
4	167-189	165-186	162-186	23
5	208-230	207-230	207-231	23
6	244-266	249-266	249-269	20
7	276-297	276-293	276-295	20

**Tabla 1.** Predicción de cruces transmembranales, para los tres programas se indica el residuo de aminoácido inicial y final de cada cruce.

### 5.3 Interrupción del gen *KISTE2*.

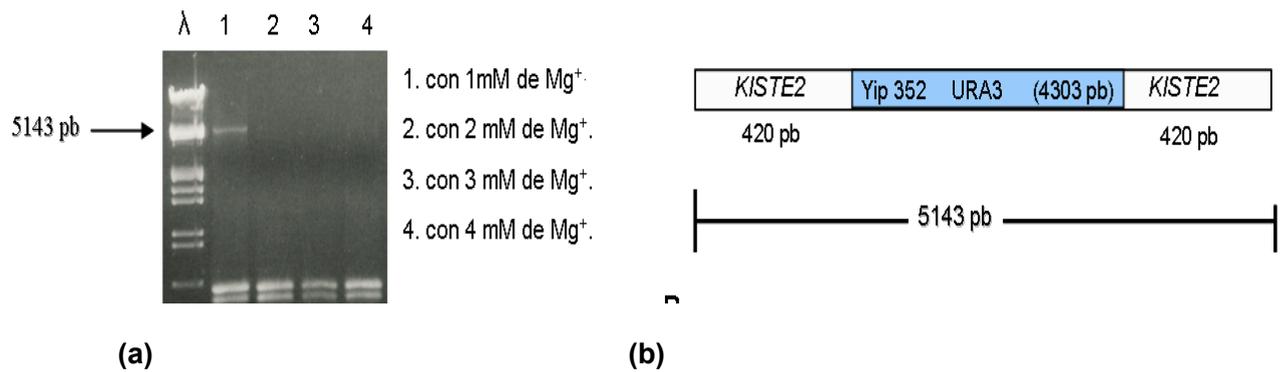
Con la finalidad de determinar la participación del gen *KISTE2* en la vía de respuesta a feromonas se interrumpió el gen, para lo cual se empleó el vector de integración Ylp352 que contiene entre otras características un gen de auxotrofia para selección (URA3), una región de clonación y además carece de origen de replicación para levadura.

La subclonación del gen *KISTE2* en el vector Ylp352, se comprobó empleando las enzimas de restricción: *EcoRI*, *HindIII*, y *HincII*. El resultado de las digestiones realizadas se puede observar en la fig. 11 a, con la enzima *EcoRI* se obtiene una banda de 4303 pb correspondiente al plásmido y una de 1370 pb equivalente al gen *KISTE2*. La digestión con *HindIII* genera dos bandas una de 4414 pb y otra de 1211 pb. La digestión con *HincII* genera cinco fragmentos: 4152 pb, 664 pb, 474 pb, 230 pb, y uno de 136 pb que por su tamaño no se ve en el gel (Fig. 11 b).



**Fig. 11 (a)** Electroforesis de las digestiones realizadas para verificar la construcción Ylp352-*KISTE2*. En la parte derecha del gel está el marcador de peso molecular ( $\lambda$ ). El carril 1 muestra la digestión con *EcoRI* en donde se obtienen dos bandas (4300pb y 1370 pb). La digestión con *HindIII* (carril 2) produce tres fragmentos, dos de ellos visibles en el gel (de 4410 y 1211pb). El tercer carril se observa la digestión con *HincII* en la que se generan cinco fragmentos, cuatro de ellos se pueden ver en la imagen y el quinto por ser de 136 pb, no es posible visualizarlo. **(b)** Representación del plásmido Ylp352 con el gen *KISTE2* en rojo, se muestran las posiciones de los sitios de restricción empleados en los ensayos.

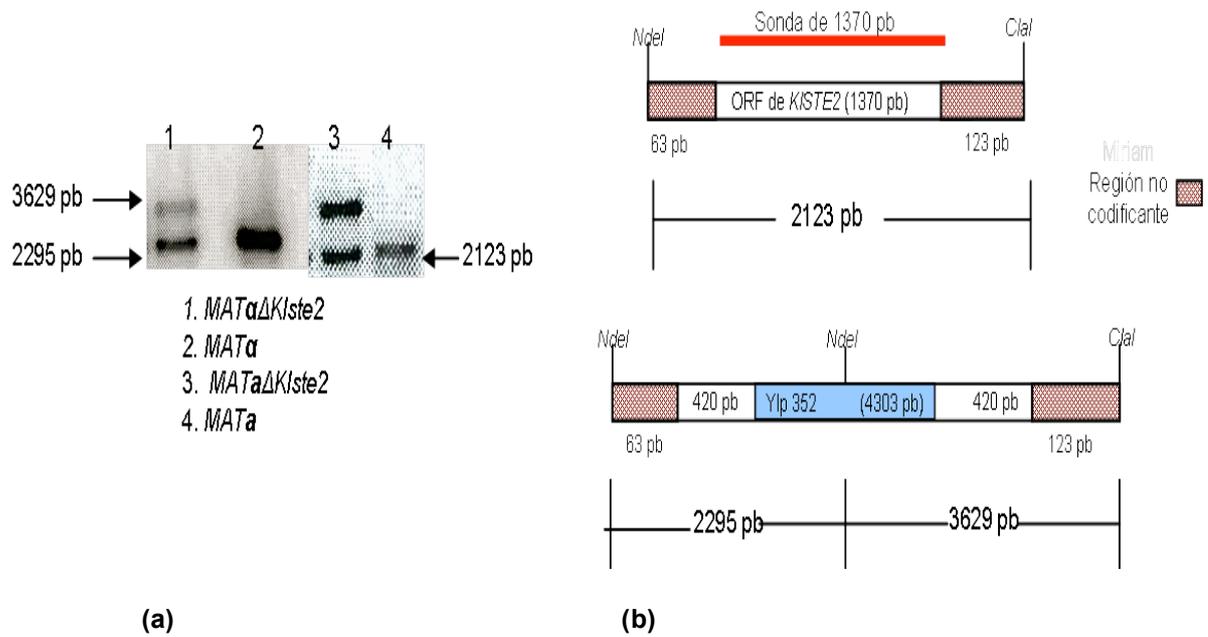
Esta construcción se utilizó como ADN molde para la amplificación por PCR, de la amplificación se obtuvo un producto de 5143 pb (Fig. 12A), que corresponde al plásmido linearizado flanqueado con 420 pb de cada lado, que pertenecen a los extremos del gen *KISTE2* (Fig. 12B). Este producto se empleó para transformar levaduras de los dos tipos sexuales de *K. lactis*, para que mediante recombinación homóloga se interrumpiera el gen silvestre.



**Fig.12** (a) Electroforesis de la PCR realizada para generar un fragmento recombinante. Se muestra las distintas concentraciones de  $Mg^{+}$  empleadas. Se observa que la reacción con 1mM de  $Mg^{+}$  (carril 1) es la única concentración a la cual se logró la amplificación del fragmento. (b) Esquema del producto de PCR, en azul el vector Ylp352 y en blanco regiones homólogas al gen *KISTE2* utilizadas para la recombinación con el gen en el locus silvestre.

Las levaduras transfectadas se analizaron mediante hibridación tipo Southern, y de este análisis se seleccionaron aquellas que tuvieran la inserción del vector Ylp352 en el locus *KISTE2*. La fig.13 muestra los resultados de la hibridación para una de las transformantes de cada sexo. En este análisis se incluyeron como controles positivos para cada sexo, las cepas silvestres.

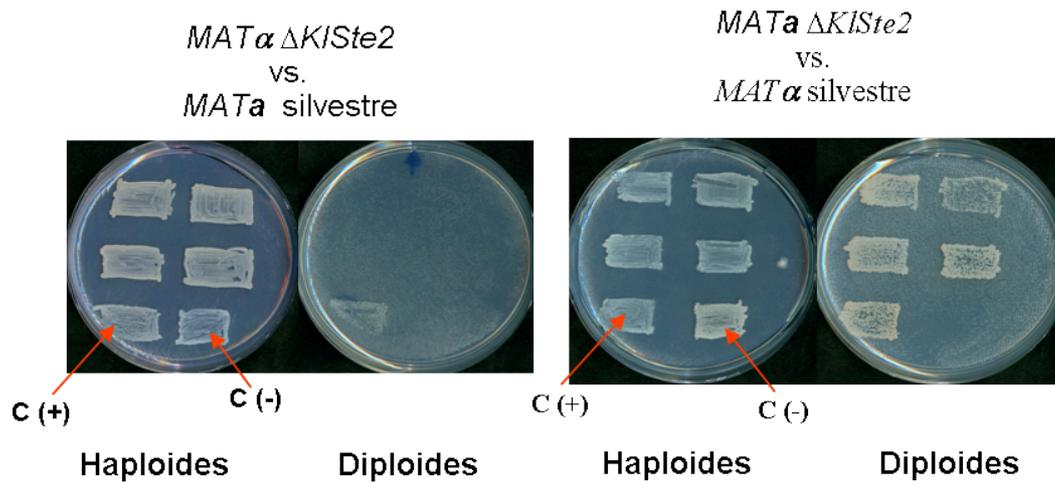
Las digestiones realizadas con las enzimas *ClaI* y *NdeI* en el ADN genómico de ambos tipos celulares (ver materiales y métodos 4.4.4) generaron en el caso de las mutantes dos fragmentos, uno de 2295 pb y otro de 3629 pb y en el caso de los controles, un fragmento de 2123 pb con los que hibridó la sonda marcada radiactivamente (Fig 13 a). Las dos bandas observadas en las mutantes se debe a un sitio interno *NdeI* en el vector Ylp352 (Fig. 13 b).



**Fig.13** (a) Hibridación tipo Southern realizada para las cepas silvestres (*MAT $\alpha$*  y *MAT $\alpha$* ) y las mutantes  $\Delta Kiste2$  para cada sexo, en ambos tipos silvestres (1 y 3) se observan dos bandas una de 3629 pb y otra de 2295 pb, y para las mutantes una banda de 2123 pb (carriles 2 y 4). (b) esquema del gen silvestre y de la interrupción del gen, en ambos casos se muestran los sitios de restricción empleados. En rojo se muestra la sonda empleada para dicha hibridación, la cual corresponde al ORF del gen *KISTE2*.

#### 5.4 Fenotipo de la mutante $\Delta Kiste2$ .

Una vez seleccionadas la mutantes  $\Delta Kiste2$  para cada tipo sexual, se llevaron a cabo ensayos de apareamiento, para poder inferir la participación del gen *KISTE2* en el sistema de respuesta a feromona. En la fig. 14 se muestran las células haploides y las células diploides obtenidas como resultado del apareamiento para cada tipo sexual. Se observa que las mutantes *MAT $\alpha$*   $\Delta Kiste2$  no se cruzaron, mientras que las mutantes *MAT $\alpha$*   $\Delta Kiste2$  se aparearon normalmente. Las cepas silvestres de cada sexo (controles positivos) se cruzaron normalmente.

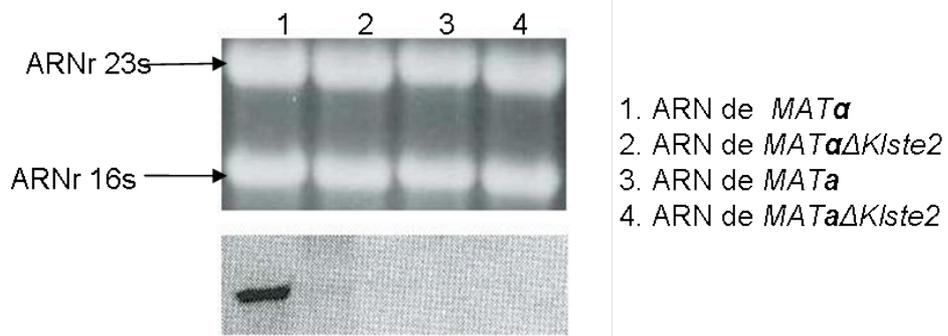


**Fig. 14** Ensayos de apareamiento de las mutantes; *MAT $\alpha$   $\Delta$ KIste2* y *MAT $\alpha$   $\Delta$ KIste2*. En cada caso se muestra del lado izquierdo las células haploides y del lado derecho las diploides obtenidas; de igual forma en ambos ensayos se observa en la parte inferior los controles positivo y negativo (C+ y C-). En los apareamientos de las mutantes *MAT $\alpha$   $\Delta$ KIste2* el C+ es una *MAT $\alpha$  silvestre*, y el C- es una cepa *MAT $\alpha$* . Mientras que para las mutantes *MAT $\alpha$   $\Delta$ KIste2* el C+ es una *MAT $\alpha$*  y el C- es una *MAT $\alpha$* .

### 5.5 Expresión del gen *KISTE2*.

Con la finalidad de comprobar que el gen *KISTE2* es sexo específico, y que por lo tanto se expresa únicamente en las células del tipo *MAT $\alpha$* , se realizó una hibridación tipo Northern, en la cual se utilizó la misma sonda que para la hibridación tipo Southern (fig.13 b).

El resultado del Northern blot se puede apreciar en la fig.15 en al cual la señal de hibridación corresponde a las células *MAT $\alpha$* . En este tipo sexual se aprecia una banda de aproximadamente 1400 pb que corresponde al ARN del gen *KISTE2*, es decir, este gen sólo se expresa en el sexo *MAT $\alpha$* , y deja de expresarse en la mutante *MAT $\alpha$   $\Delta$ klste2*. Este mismo ensayo nos muestra que en las células *MAT $\alpha$* , *KISTE2* no se expresa.



**Fig.15** Expresión del gen *STE2* en las levaduras del tipo *MATα*, *MATα*, *MATα ΔKlste2*, y *MATα ΔKlste2* de *Kluyveromyces lactis*. En la parte superior se muestra el gel de electroforesis de ARN extraído de cada tipo celular, en donde se aprecian las bandas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) con intensidades similares, lo que indica un cargado aproximadamente igual en todos los carriles. En la parte inferior se observa el resultado de la hibridación, en donde se observa que la única cepa en donde se expresa el gen *KISTE2* es en la silvestre del tipo *MATα*.

## 6. Discusión

El estudio de los sistemas de respuesta a feromonas de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Kluyveromyces lactis* nos ha mostrado que existen diferencias importantes entre ellos. En algunos sistemas de transducción que involucran a proteínas G en eucariontes superiores, la subunidad  $G\alpha$  tiene un papel activador, como pasa también en *K. lactis* donde la pérdida de esta subunidad (mutantes  $\Delta KIGpa1$ ) ocasiona un fenotipo de esterilidad parcial indicando que esta subunidad tiene un papel positivo sobre la vía (Saviñon *et al.*, 2001). En cambio en *S. cerevisiae* esta misma subunidad juega un papel inhibitorio, ya que mutantes  $\Delta ScGpa1$  ocasionan que las células detengan su división en la fase  $G_1$  debido a una activación constitutiva de la vía por el dímero  $G\beta\gamma$  (Miyajima, 1987).

Es por ello que entender el funcionamiento del sistema de respuesta a feromona en *K. lactis*, resulta bastante interesante por las implicaciones que pueda tener en los sistemas de eucariontes superiores, que además de la proteína G involucra otras proteínas. Dentro de las proteínas que forman parte importante en estos sistemas de transducción se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (RAPGs).

Dichos receptores son además importantes debido a aplicaciones farmacéuticas que pueden tener, ya que algunos fármacos empleados en el control de ciertas patologías, están dirigidos a ellos (Davey, 2004). De ahí el interés de este trabajo en caracterizar al gen *KISTE2* de *K. lactis* homólogo al gen *ScSTE2* que codifica para uno de los RAPGs que participan en la respuesta de *S. cerevisiae*.

Los receptores acoplados a proteínas G que participan en la respuesta a feromona de *S. cerevisiae*, están codificados por los genes *ScSTE2* y *ScSTE3* y se expresan diferencialmente en las células *MATa* y las *MAT $\alpha$* . En el caso de *K. lactis* existen dos genes homólogos a los genes de *S. cerevisiae* reportados en la base de datos (*KISTE2* y *KISTE3*).

En un trabajo previo se demostró que el gen *KISTE3* se expresa en las células del tipo *MATa* y que su interrupción ocasiona un fenotipo de esterilidad, además la predicción de cruces transmembranales coincide con la topología de los receptores acoplados a proteínas G (Torres-Quiroz, 2004). Por lo que este

trabajo esta enfocado en la descripción del gen *KISTE2*. El alineamiento de la secuencia de KISTe2p con ScSte2p muestra un porcentaje de identidad del 48%.

Analizando el alineamiento y la predicción de los cruces transmembranales (fig.9 y 10) nos encontramos con que las áreas más conservadas corresponden a la tercera asa intracelular y al sexto cruce transmembranal. En la literatura, estas áreas son consideradas como zonas importantes en el proceso de activación de los receptores acoplados a proteínas G (Dohlman, *et al.*, 1991). Algunos de los residuos importantes para la activación de la proteína G son los de prolina 258 y serina 259 que se encuentran en el sexto cruce transmembranal (Konopka *et al.*, 1996) los cuales están presentes tanto en KISTe2p como en ScSte2p.

El hecho de que los cruces transmembranales predichos coincidan con las zonas más conservadas en el receptor de *S. cerevisiae* refuerza la hipótesis de que KISTe2p está funcionando de una manera muy similar a ScSte2p.

La parte menos conservada entre ambos receptores es la región carboxilo terminal, la cual se ha involucrado en la regulación del receptor. Sin embargo el alineamiento muestra la presencia de varios residuos de serina (S) conservados en esta región los cuales están involucrados en la fosforilación de los RAPGs en el proceso de desensibilización. Otro residuo importante para la regulación de estos receptores es la lisina 338 (K) presente en la secuencia SINNDKSS, el cual es blanco de la ubiquitinación (Hicke *et al.*, 1998; Zhang, 1997). En la secuencia de aminoácidos de *S. cerevisiae* esta secuencia va del residuo 332 al 340, mientras que en el caso de *K. lactis* el residuo de lisina está en la posición 331.

Se ha visto que el extremo carboxilo de ScSte2p es importante en la interacción con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína G (Durán-Avelar, *et al.*, 2001) y el que estas áreas muestren diferencias significativas nos sugiere diferencias en cuanto a la interacción con la proteína G heterotrimérica. De hecho en el caso del receptor para la feromona  $\alpha$  de *K. lactis* (KISTe3p) el extremo carboxilo terminal sólo se asocia con la subunidad  $G\alpha$  y no con  $G\beta$  (Torres-Quiroz, 2004).

En cuanto al dominio involucrado en el reconocimiento del ligando, se sabe que en *S. cerevisiae* residuos como el de fenilalanina 55 (localizada en la primera hélice transmembranal) y la segunda asa extracelular ( $e_2$ ) están involucrados en la unión a la feromona (Dasil, *et al.*, 1998). En la secuencia primaria de K1Ste2p encontramos el residuo de fenilalanina en la posición 55 dentro de la primera hélice. La segunda asa extracelular de K1Ste2p (aproximadamente del residuo 198 al residuo 206) es una zona con un porcentaje muy bajo de identidad, de hecho la gran mayoría de estos residuos no se parecen. Esto nos podría estar hablando de un posible sitio de reconocimiento de la feromona, ya que si recordamos estos receptores son sexo específicos, y su implicación en procesos de apareamiento implica una alta especificidad por la feromona de cada especie y sexo.

El sistema de respuesta a feromonas de *S. cerevisiae* involucrado en la conjugación de los tipos celulares *MATa* y *MAT $\alpha$* , requiere de la activación de un receptor acoplado a proteínas G mediante la unión de una feromona. Esta señal activa toda la cascada de proteínas que lleva a la célula a formar el gameto (shmoo), necesario para la fusión. Si algún componente esencial en la vía de señalización es deletado, se observa un efecto directo en el fenotipo de las células al momento de aparearse (Dohlman, 2002). En *K. lactis* es posible observar estos fenotipos debido a la mutación de algunos genes involucrados en la vía (Coria, *et al.*, 2005).

La interrupción del gen *KISTE2* en ambos tipos sexuales de *K. lactis* ocasionó un fenotipo de esterilidad únicamente en las células del tipo *MAT $\alpha$* . Con lo que podemos decir que este gen tiene una participación en el sistema de respuesta a feromonas de la levadura y que esta participación es específica de las células *MAT $\alpha$* , mientras que las *MATa*  $\Delta$ K1ste2 se aparean normalmente ya que las *MAT $\alpha$*   $\Delta$ K1ste2 son claramente estériles debido a la ausencia del gen *KISTE2*.

La hibridación tipo Northern nos permitió confirmar que la expresión de *KISTE2* es específica para las células del tipo *MAT $\alpha$* , y que su interrupción impide su expresión en este tipo celular. Esto debido a que la expresión de dicho gen sólo se observa en la cepa silvestre *MAT $\alpha$*  y se pierde en las mutantes *MAT $\alpha$*   $\Delta$ K1ste2, mientras que en las cepas *MATa* no se expresa (Fig. 15).

Con los resultados del análisis de la secuencia, los ensayos de apareamiento con las mutantes para ambos sexos, y el análisis de la expresión del gen

*KISTE2* podemos decir que este gen participa en la respuesta a feromonas de *Kluyveromyces lactis* y que es esencial para el apareamiento de las células *MAT $\alpha$* , lo que sugiere que es el receptor para la feromona  $\alpha$  de *K. lactis*. Además el análisis de la secuencia indica una estrecha homología estructural con el receptor para la feromona  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* (ScSte2p) que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (RAPGs).

## 7. Conclusiones.

- La participación del gen *KISTE2* es esencial para las células *MAT $\alpha$*  en el sistema de respuesta a feromona de *K. lactis*. La interrupción de este gen ocasiona un fenotipo de esterilidad en las células *MAT $\alpha$* .
  
- La expresión del gen *KISTE2* se da únicamente en las células *MAT $\alpha$* , lo que significa que este gen codifica muy probablemente para el receptor de la feromona **a**.

## 8. Perspectivas

En el presente trabajo se describió el papel que juega el gen *KISTE2*, dentro del sistema de respuesta a feromonas de *K. lactis*, exponiéndose que es un gen sexo específico. Además se demostró la similitud en cuanto a secuencia respecto a ScSte2p. Sin embargo hace falta realizar algunos otros experimentos que permitan caracterizar a KISTe2p, para lo cual es necesario profundizar en los siguientes aspectos:

- Es necesario demostrar que KISTe2p es el receptor para la feromona **a**, por lo que podríamos exponer a las células *Mata* a la feromona **a** de *K. lactis* y observar la respuesta a la feromona con la consecuente formación de los shmoo.

- También se podrían realizar ensayos de expresión heteróloga de KISTe2p y ScSte2p para demostrar la complementariedad entre ambas proteínas.

- Realizar ensayos de interacción entre el receptor y la proteína G podrían servir para evidenciar las interacciones del receptor con las distintas subunidades de la proteína G.

## 9. Referencias

Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. 1997. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 177pp.

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.

Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Pinloche S, Dumuis A.G., 2002. Protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int Rev Cytol.*;212:63-132.

Brunner A., 1981. Mutaciones mitocondriales en levadura. *Temas Selectos en Fisiología Celular*. Ed. Peña A., Drucker-Colín R., Tapia R. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F.

Bukusoglu G, Jenness DD. 1996. Agonist-specific conformational changes in the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol Cell Biol*. Sep;16(9):4818-23.

Campbell, I. 1987. *Brewing Microbiology*. Edited by F.G. Priest and I. Campbell. Elsevier Applied Science. England. Cap. 1 "Systematics of yeast" 1-47.

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*, May; 6(3): 336-44.

Davey J. 2004. G-protein-coupled receptors: new approaches to maximise the impact of GPCRS in drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. Apr;8(2):165-70.

Dickinson J.R. y Schweizer M. 2004. *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Segunda edición. CRC Press. 459 pp.

Dohlman H. G., and Thorner JW, 2001. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem*;70:703-54.

Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. 1996. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol.* Sep;16(9):5194-209.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60: 653-88.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:653-88.

Dohlman H. G., 2002. G Proteins and Pheromone Signaling. *Annual Reviews of Physiology*, 64:129-52.

Dosil M, Giot L, Davis C, Konopka JB. 1998. Dominant-negative mutations in the G-protein-coupled alpha-factor receptor map to the extracellular ends of the transmembrane segments. *Mol Cell Biol.* Oct; 18(10):5981-91.

Dosil M, Schandel KA, Gupta E, Jenness DD, Konopka JB. 2000. The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Mol Cell Biol.* Jul; 20 (14): 5321-9.

Durán-Avelar m.J., Ongay-Larios L., Zentella-Dehesa A., and Coria R. 2001. the carboxi-terminal tail of the Ste2 receptor is involved in activation of the G protein in the *Saccharomyces cerevisiae* a-pheromone response pathway. *FEMS Microbiol Lett.* 197:65-71.

Haber, J.E. 1998. Mating-type gene switching in *Sacharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 32, 561-99.

Hicke L, Zanolari B, Riezman H. 1998. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol.* Apr 20;141(2):349-58.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins *Bioinformatics.* 14(4):378-9.

Hoffman C. S., 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.

Hofmann & W. Stoffel. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166.

Jiménez L. F., 2003. Capítulo 7, Transducción de Señales. *Biología celular y molecular*. Editorial PEARSON.

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.

Kawasaki L., Saviñon-Tejeda A. L., Ongay-Larios L., Ramírez J., y Coria R. 2005. The Gb (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.

Kocková-Kratochvilová, A. 1990. *Yeast and yeast-like organisms*. VCH Publishers, New York. 528 pp.

Konopka, J. B., Jennes, D. D. and Hartwell, L.H., 1988. The carboxyl-terminal segment of the yeast  $\alpha$ -pheromone receptor mediates an response to feromone. *Cell* 54, 609-620.

Ladds G, Davey J. 2004. Analysis of human GPCRs in fission yeast. *Curr Opin Drug Discov Devel*. Sep;7(5):683-91.

Ladds G, Davis K, Das A, Davey J. 2005. A constitutively active GPCR retains its G protein specificity and the ability to form dimers. *Trends Biotechnol*. Jul;23(7):367-73.

Ladds G, Goddard A, Davey J. 2005. Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast. *Trends Biotechnol*. Jul;23(7):367-73.

Miyajima I, Nakafuku M, Nakayama N, Brenner C, Miyajima A, Kaibuchi K, Arai K, Kaziro Y, 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*. Sep 25;50(7):1011-9.

Nasim A., Young P., y Johnson B.F. 1989. *Molecular Biology of the Fission Yeast*. Academic Press Inc. California. 469 pp.

Navarro-Olmos R. C., 2006. La vía de respuesta a feromonas de apareamiento de la levadura *Kluyveromyces lactis*, no requiere de la subunidad Gg (KlSte 18p) para la activación del sistema. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.

Rost B, Fariselli P, Casadio R. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci*. 1996 Aug;5(8):1704-18.

Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Segunda edición. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA.

Saviñon-Tejeda A. L., Ongay-Larios L., Valdés-Rodríguez J., y Coria R. 2001. The KlGpa1 Gene Encodes a G-Protein a Subunit That Is a Positive Control Element in the Mating Pathway of the Budding Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 183: 229-234.

Schaffrath R. y Breuning K. D. 2000. Genetics and Molecular Physiology of the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 173-190.

Strader C. d., Fong t. M., Tota M. R. and Underwood D., 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-32.

Strader CD, Fong T. M., Graziano M. P., Tota M. R., 1995. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J*. 1995 Jun;9(9):745-54.

Torres-Quiroz J. F., 2004. Papel del receptor Ste3p en el sistema de respuesta a feromonas sexuales de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Watson S. and Arkinstall S., 1994. *The G-protein linked receptor*. Facts Book. Academic Press limited. San Diego, C.A., USA. 427pp.