



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**LA SUBUNIDAD  $\beta$  DE LA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉERICA ES  
CAPAZ DE ACTIVAR LA VÍA DE RESPUESTA A FEROMONAS  
DE APAREAMIENTO DE *Kluyveromyces lactis* EN AUSENCIA DE  
LA SUBUNIDAD  $\gamma$**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**  
PRESENTA:

Biol. Rocío del Carmen Navarro Olmos

TUTOR PRINCIPAL:  
**DR. ROBERTO CORIA ORTEGA.**

COMITÉ TUTORAL:  
DR. DIMITRIS GEORGELLIS  
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

México, D.F.

Marzo, 2011



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.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de  
CONACyT proyecto No. 44178  
y de PAPIIT, DGAPA, UNAM IN211906

Gracias también, al financiamiento recibido  
por la beca de CONACyT.  
Registro de becario No. 203277

También se recibió apoyo económico por parte del  
Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

Agradecemos los comentarios recibidos por Nancy R. Gough, editora de la revista Science Signaling, al artículo publicado con los datos presentados en esta tesis.

Agradecemos el apoyo técnico recibido de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradecemos el apoyo técnico recibido de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.



# GRACIAS

Al Dr. Roberto Coria:

Gracias Roberto por tantos años de paciencia y de enseñanzas. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos, tu tiempo, tus opiniones... por ser un gran tutor y maestro. Gracias por las alegrías, los disgustos, y las largas pláticas. Gracias por las comidas, las risas, los chistes, la música, por tu amistad y confianza. Gracias Doc!!!

Al Dr. Dimitris Georgellis y al Dr. Marco Cerbón:

Gracias por sus consejos durante tantos tutorales, gracias por enriquecer mi trabajo con sus experiencias y sus comentarios.

A mis sinodales: Dra. Claudia González, Dra. Rosa Navarro, Dr. Alejandro Zentella y Dr. Juan Pablo Pardo.

Gracias por sus consejos y comentarios tan acertados para la elaboración de esta tesis. Gracias por su tiempo a pesar de sus compromisos.

A Sergio:

Gracias Bun por tu apoyo, tu compañía, tu comprensión y tu ayuda en los momentos de histeria mientras escribía esta tesis (y en todos los otros momentos también). Gracias por hacerme sonreír, enojar, llorar, reír... Gracias por subirte conmigo al barco de la vida que quien sabe a donde nos llevará.

A mis padres:

Gracias por apoyarme aunque no me entiendan nada nadita.

A Brock:

Gracias por escucharme, por platicarme, por entenderme, por compartir conmigo, por acompañarme y decir tonterías conmigo. Gracias por reírte conmigo a carcajadas cuando parece no haber motivo.

A Fana:

Gracias por preocuparte por mi, gracias por darme consejos, y por ayudarme o por lo menos intentarlo, porque sé que no está fácil ayudar a alguien tan necio como yo.

A Laurita Kawasaki:

Gracias!!!!!! Sencillamente no podría haber hecho nada sin tu ayuda. Gracias por tu ayuda en los experimentos, gracias por la "asesoría técnica gratuita", gracias por las platicas y las risas a medio pasillo, gracias por aguantar a alguien tan chiflado como yo, gracias por escucharme y aconsejarme en asuntos no tan académicos. Gracias por tu amistad y tu alegría de siempre.

A Gerardo Coello:

Gracias Coello por alivianar los días más horribles y los más tediosos, y por hacer divertidos los días comunes. Gracias por preocuparte y por tener buenos consejos, gracias por ser sincero, gracias amigo Coello!

A Laura Ongay:

Cafestio! Je je... gracias Laurita por que tu ayuda siempre es oportuna, y tus consejos siempre son acertados, y porque no siempre son académicos.

A Mary:

Gracias Mary por tu infinita paciencia con esta bola de científicos locos que todo ensucian, gracias por siempre tener buena disposición y porque mantienes al labo andando.

A Rodrigo:

Gracias Colega! Por que sin ti la estancia en el instituto hubiera sido terriblemente tediosa. Gracias por tu amistad invaluable. Gracias por ser cómplice de mis babosadas y de mis carcajadas. Gracias por alentar la locura. Gracias por el apoyo que viene desde del otro lado del océano. Ah! Y gracias por intentar enseñarme bioquímica aunque ya sabías que no era tarea fácil... jajaja.

A Edith:

Gracias Editha porque trapear y barrer no podría ser más divertido sin ti. Gracias por confiar en mí, gracias por apoyarme, por escucharme, por aguantarme, gracias por ser sincera, por tus comentarios alentadores, gracias por levantarme del suelo, gracias por ser mi hermanita!

A Bassols:

Gracias Karla por estar conmigo, por aguantar mis intermitencias. Porque puedo contar contigo, porque sé que tu amistad no tiene límites. Gracias!

A Carlos:

Gracias Carlitos por las pláticas de pasillo, por las pláticas de horas, por la sinceridad, por los temas raros que no se pueden conversar con cualquiera. Gracias por involucrarme en tus locuras, y por preocuparte por mi.

A Carolina García de Alba:

Gracias gracias gracias gracias!!! Por las materias del posgrado se volvieron divertidísimas, porque hacer la tarea por chat se volvió un juego. Gracias por hacerme reír de una manera tan inocente. Porque eres una persona que admiro mucho, por tu gran corazón, y porque se platica tan a gusto contigo, caray!

A Hana, a Chabelita, a Winnie y a Lorena:

Gracias por más de 20 años de amistad! Porque sé que soy una persona complicada, pero aún así me quieren y me cuidan. Gracias por aguantar mi loca manera de ser y de pensar, gracias por comprenderme aunque no me entiendan, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme. Gracias por estar ahí junto a mí.

A Liz Sánchez:

Gracias Liz por ponerme los pies en la tierra. Gracias por que tus consejos siempre van acompañados de un deseo sincero de ayudarme.

A Dany, Serch, Luisito y Manolo:

Que labo! Gracias por hacer del pasillo un lugar agradable. Gracias por los reveses, por las risas, las locuras, gracias por ser colegas y amigos!

A Gina y a Hugish:

Ginaaa! Hugoo! Gracias amigos por hacerme reír a carcajadas tantas veces, por su buen humor, y por su elocuencia.

A Labardini:

Gracias Gabar por estar y no estar y volver a estar. Por que tu amistad es muy valiosa para mi, y porque a pesar de todo, seguimos juntos.

A Miriam y a Nancy:

Gracias por años y años y años de compañía diaria. Gracias por los buenos y los malos momentos, porque al final logramos superarlos y dejaron muchísimas enseñanzas. Gracias por empezar conmigo esta aventura "experimental" y acompañarme a terminarla.



A Uriel, a Abraham, a Eunice, a Natalia, a Marcela y a Pablo:  
Gracias por hacer un gran equipo! Porque la alegría y la buena convivencia es algo muy difícil de lograr con tantas personas, pero ustedes lo hacen posible. Gracias por sus risas y su buen humor constantes que producen inevitablemente una sonrisa en las personas que los rodeamos. Gracias por hacer más llevadero el trabajo diario.

# ÍNDICE

Contenido	Página
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	3
3.1. Las levaduras como modelo de estudio	3
La reproducción sexual de <i>S. cerevisiae</i>	4
3.2. La transducción de señales por proteínas G	5
Las proteínas G	5
3.3. Las proteínas G heterotriméricas	7
3.4. La subunidad $G\alpha$	9
Las modificaciones post-traduccionales de $G\alpha$	10
La subunidad $G\alpha$ en las levaduras	10
3.5. El dímero $G\beta/G\gamma$	11
Las hélices superenrolladas	13
El tráfico y ensamblaje del dímero $G\beta/G\gamma$	14
El dímero $G\beta/G\gamma$ en las levaduras	15
3.6. La vía de respuesta a feromonas de apareamiento	16
La subunidad $G\gamma$ no es necesaria para el apareamiento	19
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	21
<b>5. HIPÓTESIS</b>	22
<b>6. OBJETIVO</b>	22
<b>7. MATERIALES</b>	23
7.1. Cepas	23
7.2. Medios	23
<b>8. METODOLOGÍA</b>	25
8.1. Generación de mutantes y construcciones	25
8.2. Ensayos de apareamiento	27
8.3. Ensayos de doble híbrido	27
8.4. Fraccionamiento celular	28
8.5. Ensayos de inmunodetección	29
8.6. Modelado de proteínas	29
<b>9. RESULTADOS</b>	30
9.1. Análisis estructural de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de <i>K. lactis</i>	30
9.2. Análisis de las interacciones entre las subunidades de la proteína G heterotrimérica	33
9.3. Análisis del fenotipo de las mutantes de la proteína G	34
9.4. Estudio de la localización de $KIG\beta$	36
9.5. Estudio de la localización de $KIG\beta$ en ausencia de $KIG\gamma$	38
9.6. Fusión del motivo CCAAX a la subunidad $KIG\beta$	42
<b>10. DISCUSIÓN</b>	45
<b>11. CONCLUSIÓN</b>	51
<b>12. PERSPECTIVAS</b>	52
<b>13. COMENTARIO EN SCIENCE SIGNALING POR Nancy R. Gough</b>	53
<b>14. REFERENCIAS</b>	54
<b>15. ARTÍCULO: The <math>\beta</math> subunit of the heterotrimeric G protein triggers the <i>Kluyveromyces lactis</i> pheromone response pathway in the absence of the <math>\gamma</math> subunit</b>	62

---

## 1. RESUMEN

Las proteínas G heterotriméricas son importantes componentes de los sistemas de transducción de señales en las células. En levaduras transmiten señales presentes en el medio ambiente, señales que son muy importantes para la supervivencia del organismo como la disponibilidad de alimento o la presencia de feromonas en el medio. El interés principal de este trabajo es caracterizar y estudiar la participación de la proteína G heterotrimérica en la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en la levadura *Kluyveromyces lactis*.

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ . Las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  forman un heterodímero que actúa como una sola unidad en todos los sistemas en los que se ha estudiado. En levaduras la subunidad  $G\alpha$  que tiene actividad de GTPasa puede detectar el estímulo de las feromonas a través del receptor, mientras que el dímero  $G\beta/G\gamma$  activa a los efectores río abajo.

La formación de una unidad funcional formada por el heterodímero  $G\beta$  y  $G\gamma$  se considera un dogma en el área de la transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que en la levadura *K. lactis*, la subunidad  $G\beta$  puede activar la vía de respuesta al apareamiento en ausencia de  $G\gamma$ . A diferencia de lo que se ha observado en otras especies de levaduras, en células de mamíferos y en otros organismo eucariontes, la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* puede anclarse a la membrana plasmática y puede ser activada por el receptor de feromona aún en ausencia de la subunidad  $G\gamma$ .

---

## 2. ABSTRACT

Heterotrimeric G proteins are important components in cell signaling transduction systems. In yeast, these proteins are targets of some environmental stimuli such as sexual pheromones and glucose. The principal interest of this work is to determine the role of the *Kluyveromyces lactis* heterotrimeric G protein in the pheromone response pathway, required for mating between haploid cells.

Heterotrimeric G proteins are composed by three different subunits, G $\alpha$ , G $\beta$  and G $\gamma$ . The G $\beta$  and G $\gamma$  subunits form a heterodimer, which acts as a unit in all systems studied so far. In yeast, the guanine nucleotide-binding subunit G $\alpha$  senses the pheromone stimulus through the receptor, while G $\beta$ /G $\gamma$  dimer activates downstream effectors. G $\beta$  and G $\gamma$  act as a dimer. This fact is considered a paradigm in signal transduction systems mediated by heterotrimeric G proteins. However, we found that in *Kluyveromyces lactis* G $\beta$  can trigger the mating pathway in the absence of G $\gamma$ . In contrast to other yeast species, mammalian cells and eukaryotic organisms in general, G $\beta$  in *K. lactis* can be attached to the plasma membrane and can be activated by the pheromone receptor when the G $\gamma$  subunit is missing.

---

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. Las levaduras como modelo de estudio

A pesar de la evidente distancia evolutiva que existe entre las levaduras y los mamíferos, los componentes de las vías de señalización acopladas a proteínas G heterotriméricas están altamente conservados, incluso a nivel de secuencia nucleotídica. Esto hace posible hacer comparaciones entre genes de diferentes especies de levadura y buscar así motivos de interés, o identificar y clonar genes de vías de señalización comunes.

Algunas de estas vías de transducción se conservan en organismos superiores como en mamíferos, plantas y nemátodos, entre otros. En mamíferos, por ejemplo, se ha encontrado un gran número de genes que codifican para las subunidades que componen las proteínas G heterotriméricas y para receptores acoplados a estas proteínas. Muchos de estos genes se han identificado como homólogos de los genes de levadura que codifican para la proteína G heterotrimérica que participa en la respuesta a las feromonas de apareamiento.

Las características biológicas y fisiológicas de las levaduras, y la similitud de sus genes con los de otros organismos más complejos, hacen de este grupo de hongos un buen modelo para el estudio de los sistemas de transducción de señales.

En este trabajo describimos el sistema de apareamiento de la levadura *Kluyveromyces lactis* y hacemos una constante comparación de este sistema con el de *Saccharomyces cerevisiae*, que es el sistema de transducción más estudiado de todos los eucariontes. Ambas especies son levaduras gemantes pertenecientes al grupo de los hemiascomycetos.

## La reproducción sexual de *S. cerevisiae*.

El ciclo de reproducción de las levaduras consta de una fase asexual o vegetativa y de una fase sexual. En el ciclo vegetativo, las levaduras se dividen por gemación, la célula madre forma una gema que dará origen a la célula hija. Durante la formación de la gema ocurre división nuclear, síntesis de pared celular y finalmente la separación de las dos células. Durante este tipo de crecimiento no hay intercambio genético.

Por otro lado, el ciclo sexual consiste de dos procesos: conjugación y esporulación. En la conjugación, dos células haploides de sexos opuestos se fusionan, dando origen a una célula diploide (figura 1). Este proceso es inducido por factores sexuales secretados por las células, conocidos como feromonas, que son reconocidas por receptores transmembranales específicos acoplados a proteínas G heterotriméricas. En respuesta al estímulo de la feromona, la proteína G activa una cascada de señalización que lleva a la activación de MAP cinasas (Mitogen Activated Protein Kinase) que inducen la transcripción de genes que conducen a la formación del gameto y a la interrupción del ciclo celular en la fase G1.

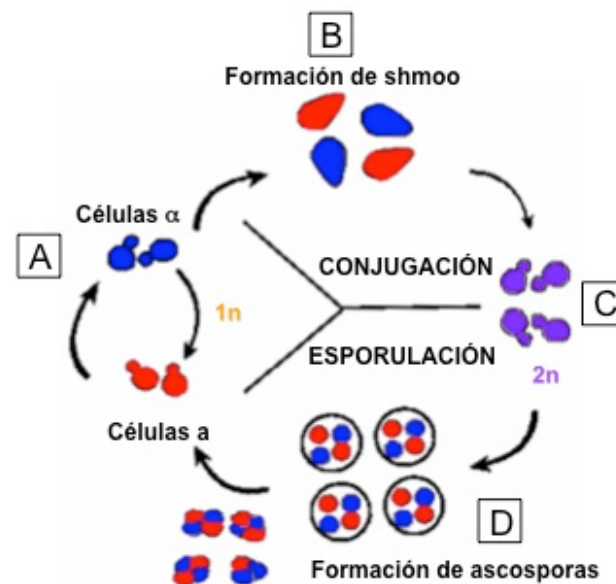


Figura 1. Ciclo de reproducción sexual de levaduras gemantes. Las células haploides de tipos celulares contrarios (A), forman una estructura conocida como shmoo en respuesta al estímulo de la feromona y se aparean por conjugación (B). Como resultado del apareamiento se obtienen células diploides (C) que pueden dividirse vegetativamente por gemación. En condiciones de limitación de nitrógeno y carbono, las células diploides sufren meiosis y esporulan (D). Eventualmente las esporas germinan y forman células haploides de ambos sexos.

---

Las células estimuladas por la feromona adquieren una estructura alargada y polarizada hacia un extremo, la cual se conoce como shmoo. La punta del shmoo hace contacto con la célula del tipo celular opuesto para conjugarse. Como resultado de la conjugación se obtienen células diploides, que pueden dividirse vegetativamente por gemación o pueden esporular si encuentran las condiciones adecuadas. En la esporulación las células sufren meiosis; cada célula genera cuatro esporas (ascosporas) cubiertas por una capa llamada asca, dos de estas esporas son de un tipo celular (**a**) y las dos esporas restantes son del tipo celular contrario ( $\alpha$ ). Las ascosporas son liberadas al medio para germinar y dar lugar a nuevas células haploides (Nasim, A., *et al.*, 1989; Kocková-Kratochvílová, A., 1990; Jones, E.W., *et al.*, 1992; Dickinson, J.R. y Schweizer, M., 2004) (figura 1).

### **3.2. La transducción de señales por Proteínas G**

Es importante que los organismos unicelulares se relacionen e interactúen con el medio en el que se desarrollan. Es necesario que conozcan los cambios que ocurren para poder adaptarse a ellos y sobrevivir. Esta relación con el entorno se da gracias a sensores y receptores que reconocen las señales del exterior y transmiten el mensaje hacia el interior de la célula. Las proteínas G son transductores muy importantes, conservados en los eucariontes que transducen varios tipos de estímulos como hormonas, luz, olores y en eucariontes inferiores, estímulos como las feromonas que son de particular interés en nuestro trabajo, ya que son las responsables de inducir el apareamiento en las levaduras.

#### **Las proteínas G**

Las proteínas G forman una familia de proteínas con actividad de hidrolasas de GTP (GTPasas). Actúan como interruptores moleculares en las vías de señalización celular. La unión de estas proteínas a GDP o GTP determina su afinidad por otras proteínas río abajo en la señalización (Pandit, S.B. y Srinivasan, N., 2003). Están acopladas a receptores específicos conocidos como GPCRs (por G Protein Coupled Receptors). Cuando el ligando se une al GPCR induce cambios conformacionales en él,

---

que a su vez inducen cambios conformacionales en  $G\alpha$  que permiten el recambio de GDP a GTP, este intercambio de nucleótidos favorece la activación de los efectores. Estas proteínas participan en procesos esenciales para las células como diferenciación y proliferación, y participan en transducir señales de un lado a otro de la membrana como aquellas generadas por señales hormonas y luz, tráfico de proteínas, secreción, organización del citoesqueleto, movilidad celular y síntesis de proteínas (Bourne, H.R., *et al.*, 1990; Bourne, H.R., *et al.*, 1991; Pandit, S.B. y Srinivasan, N., 2003).

Pandit, SB., *et al.*, 2003 propone que la familia de proteínas G puede clasificarse en 4 subfamilias de acuerdo con sus funciones biológicas:

- 1) Proteínas G pequeñas, conservadas en todos los eucariontes, desde las levaduras hasta los humanos. Dentro de este grupo se encuentran las GTPasas pequeñas del tipo Ras, Rho, Rac, Cdc42, Rab, Arf1, Sar1 y Ran que participan en diversas funciones como la organización del citoesqueleto y el tráfico vesicular (Boguski, M.S., y McCormick, F., 1993; Downward, J., 1990).
- 2) GTPasas traduccionales, a este grupo pertenecen las proteínas G que están involucradas en el proceso de síntesis de proteínas, como la subunidad  $\gamma$  del factor de iniciación 2 (eIF2 $\gamma$ ), el factor de elongación Tu (EF-Tu), factor de elongación G (EF-G) y el factor de liberación 3 (RF3) (Laalami, S., *et al.*, 1996).
- 3) Proteínas G grandes, es un grupo al que pertenecen proteínas de alto peso molecular que tienen diversas funciones como la endocitosis (Van der Blik, A.M., 1999) y resistencia viral (Staeheli, P., *et al.*, 1993).
- 4) Proteínas G heterotriméricas, formadas por tres subunidades, que actúan como dos módulos funcionales. A continuación se hará una revisión más amplia acerca de este grupo de proteínas.



### 3.3. Las proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres diferentes subunidades,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ . Cuando la subunidad  $G\alpha$  se encuentra asociada a GDP forma un trímero con las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , esta asociación constituye la forma inactiva de las proteínas G heterotriméricas (figura 2). Cuando un estímulo externo activa al receptor, entonces el GTP reemplaza al GDP. Esto genera un cambio conformacional en la subunidad  $G\alpha$  que permite su disociación del dímero  $G\beta/\gamma$ , este es el estado activo de la proteína G heterotrimérica (figura 2), ya que permite que tanto la subunidad  $G\alpha$  como el dímero  $G\beta/\gamma$  interactúen con otras proteínas modulando su actividad (Spiegel, A.M., *et al.*, 2004; Dohlman, H.G., 2002; Hamm, H., 1998; Whiteway, M., *et al.*, 1989; Dickinson, J.R., y Schweizer, M., 2004). Ambas unidades funcionales,  $G\alpha$  y  $G\beta/\gamma$ , son capaces de regular la actividad de los efectores. En algunos sistemas sólo la subunidad  $G\alpha$  puede activar efectores, pero en otros sistemas, como la respuesta a feromonas en *S. cerevisiae*, es el dímero  $G\beta/\gamma$  el que tiene la capacidad de transmitir el estímulo río abajo.

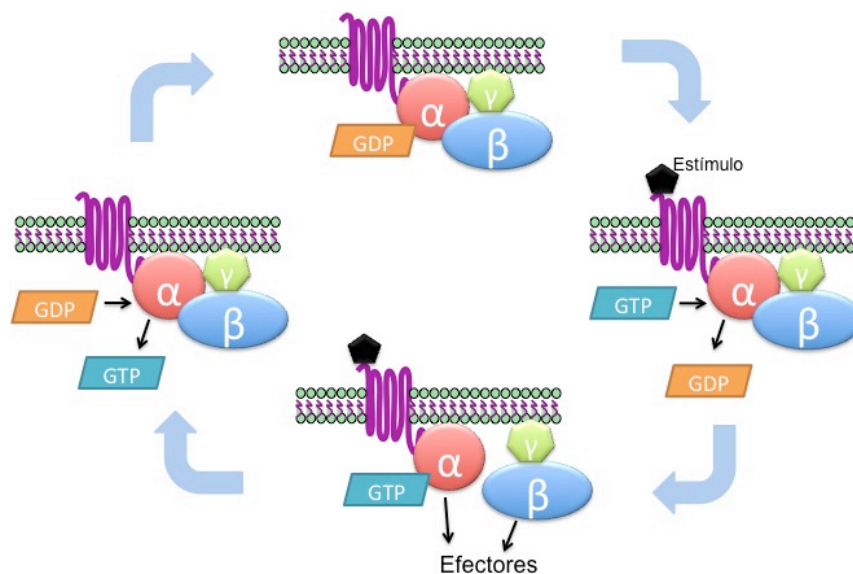


Figura 2. Ciclo de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas. Cuando el estímulo activa al receptor entonces la subunidad  $G\alpha$  intercambia GDP por GTP y se disocia del dímero  $G\beta/\gamma$ , de manera que tanto la subunidad  $G\alpha$ , como el dímero  $G\beta/\gamma$  pueden activar a sus efectores. Cuando la subunidad  $G\alpha$  hidroliza el GTP a GDP, el heterotr trímero se reasocia nuevamente y se detiene la transmisión de la señal.

La subunidad  $G\alpha$  tiene actividad intrínseca de GTPasa que le permite regresar a su estado inactivo unido a el GDP. Sin embargo, hay otras proteínas accesorias, las RGS (por Regulator G- protein Signaling) que le permiten regular su unión al nucleótido.

---

Como la familia de Proteínas Activadoras de GTPasa, GAP's (por GTPase Activating Protein), que aumentan la capacidad de hidrólisis del GTP. Otro grupo de reguladores son los Factores Intercambiadores de Nucleótido de Guanina, GEF's (por Guanine Nucleotide Exchange Factor), que ayudan a catalizar el intercambio de GDP por GTP. Y los Inhibidores de Intercambio de Nucleótidos, GDI (por Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor), que inhiben la liberación de GDP de algunas proteínas G. (Pandit, S.B. y Srinivasan, N., 2003; Siderovski, D.P, y Willard, F.S., 2005).

Las levaduras tienen varios tipos de proteínas G pequeñas, sin embargo, sólo tienen un tipo de proteína G heterotrimérica, es decir, sólo poseen un gen que codifica para la subunidad  $G\beta$  y uno que codifica para la subunidad  $G\gamma$ . Estos forman un solo tipo de dímero  $G\beta/G\gamma$  que se une a una subunidad  $G\alpha$  específica, pero hay dos subunidades  $G\alpha$  diferentes, Gpa1p y Gpa2p (Whiteway, M., *et al.*, 1989; Colombo, S., *et al.*, 1998).

En *S. cerevisiae* Gpa2p actúa como proteína G monomérica (Colombo, S., *et al.*, 1998) y está acoplada al receptor Gpr1p que responde a la disponibilidad de glucosa en el medio. En respuesta a este estímulo, Gpa2p activa AMPc y se induce el ciclo fermentativo (Versele, M., *et al.*, 2001; Kraakman, L., *et al.*, 1999).

La otra subunidad  $G\alpha$  es Gpa1p. Esta subunidad forma parte de la proteína G heterotrimérica y está acoplada al receptor a feromonas, la respuesta que regula permite que las células se apareen (Dietzel, C., y Kurjan, J., 1987).

En las levaduras las proteínas G heterotriméricas son transductores muy importantes para la sobrevivencia de la célula, ya que participan en procesos tan importantes como la reproducción sexual y el crecimiento filamentoso o vegetativo, que depende de la disponibilidad de nutrientes en el ambiente.

### 3.4. La subunidad G $\alpha$

Como se mencionó anteriormente, la subunidad G $\alpha$  tiene un dominio de unión a nucleótido de guanina, lo que permite la activación o inactivación de toda la proteína G heterotrimérica. Este dominio de GTPasa está formado por 6 hojas- $\beta$  y 5  $\alpha$ -hélices (figura 3), 5 de los 6 giros que forman parte de esta estructura participan en la unión al nucleótido y están conservados dentro de las diferentes familias.

Otro dominio importante de la subunidad G $\alpha$  es el dominio de unión a G $\beta$ /G $\gamma$ . El extremo amino terminal de G $\alpha$  es particularmente importante para su interacción con la subunidad G $\beta$  (figura 3, en color amarillo), este extremo forma una  $\alpha$ -hélice que interacciona con una de las hojas- $\beta$  que forman la estructura de propela de la subunidad G $\beta$  (Smrcka, A.V., 2008; Spiegel, A.M., *et al.*, 1994). Hay una segunda estructura, la  $\alpha$ -hélice 2 del dominio de GTPasa, que también interacciona con la estructura de propela de G $\beta$  (figura 3, en color azul marino). El intercambio de nucleótidos de guanina alteran la interacción de G $\alpha$  con el dímero G $\beta$ /G $\gamma$  (Smrcka, A.V., 2008; Spiegel, A.M., *et al.*, 1994; Sondek, J., *et al.*, 1996).

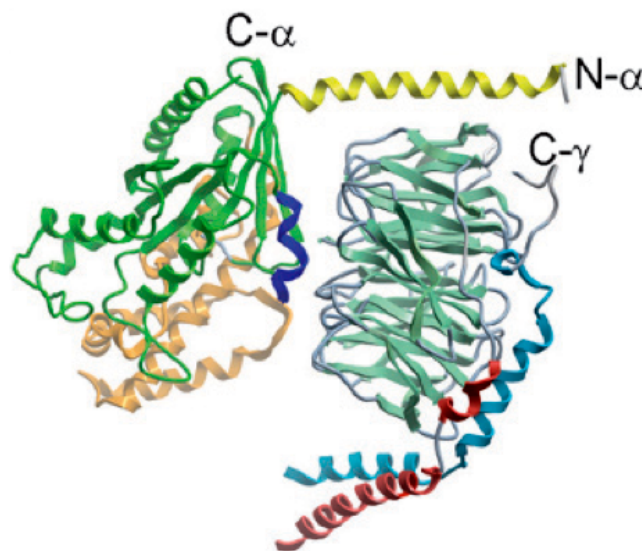


Figura3. Modelo de listón de la proteína G heterotrimérica de mamífero. De lado izquierdo de la figura se muestra la subunidad G $\alpha$ , de lado derecho de la figura la subunidad G $\beta$  y en color azul agua la subunidad G $\gamma$ . En color amarillo se muestra el extremo amino-terminal de la subunidad G $\alpha$  que interactúan con G $\beta$ . En color rojo se observa el extremo amino-terminal de la subunidad G $\beta$  que interactúa con el extremo amino-terminal de G $\gamma$ . En azul marino se muestra la región de G $\alpha$  que sufre cambios conformacionales después de la unión de GTP (Smrcka, 2008; Wall, M.A., *et al.*, 1995).

Uno de los dominios importantes de  $G\alpha$ , probablemente el más estudiado, es el dominio de interacción con el receptor. Los GPCRs son receptores de 7 segmentos transmembranales. La subunidad  $G\alpha$  interactúa con su receptor principalmente por el extremo carboxilo-terminal, en donde también se da la especificidad de cada subunidad  $G\alpha$  por su receptor particular (Spiegel, A.M., *et al.*, 1994). El extremo amino-terminal de  $G\alpha$  también participa en la interacción con el receptor (Spiegel, A.M., *et al.*, 1994; Torres-Quiroz, F., *et al.*, 2007).

### **Las modificaciones post-traduccionales de $G\alpha$**

Es muy importante que la subunidad  $G\alpha$  se encuentre en la membrana plasmática porque el estímulo y la transducción de la señal se dan a nivel de este organelo, la localización membranal ocurre a través de modificaciones lipídicas post-traduccionales: palmitoilación y miristoilación. La palmitoilación es una modificación conservada en las subunidades  $G\alpha$  que consiste en la adición de palmitato en un residuo de cisteína. Se ha observado que la ausencia de la palmitoilación afecta considerablemente la actividad de la subunidad  $G\alpha$  (Spiegel, 1994). La miristoilación consiste en la adición de un grupo miristilo (derivado del ácido mirístico) en un residuo de glicina en el extremo amino-terminal (Figura 4). Se sabe que esta modificación lipídica estabiliza la interacción con la subunidad  $G\beta$ , sin embargo, no todas las subunidades  $G\alpha$  sufren de miristoilación (Spiegel, 1994).

### **La subunidad $G\alpha$ en las levaduras**

En las levaduras hay dos especies de subunidades  $G\alpha$ . En general solo una de ellas forma un heterotrímero con el dímero  $G\beta/G\gamma$ . En *S. cerevisiae* y en *K. lactis* la subunidad  $G\alpha$  (Gpa1p) está acoplada a los receptores a feromonas. En ausencia de estos receptores,  $G\alpha$  (Gpa1p) se encuentra inactiva formando un heterotrímero con el dímero  $G\beta/G\gamma$  (Ste4p/Ste18p).

La subunidad  $G\alpha$  de *K. lactis* (KlGpa1p) muestra alta identidad con la subunidad  $G\alpha$  (Gpa1p) de *S. cerevisiae*: 64% de identidad. Tiene conservadas las regiones G1 y G2 involucradas en la unión e hidrólisis del nucleótido de guanina, al

igual que la secuencia consenso blanco de miristoilación (Figura 4) (Saviñon-Tejeda, A.L., *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo de transducción del estímulo es diferente en ambas levaduras,  $G\alpha$  (Gpa1p) de *S. cerevisiae* es un regulador negativo de la actividad del dímero  $G\beta/G\gamma$ . En una cepa carente de  $G\alpha$  (Gpa1) el dímero permanece constitutivamente activo, por lo que las células no pueden dividirse y mueren (Whiteway, M., *et al.*, 1989). Por el contrario, en *K. lactis* la subunidad  $G\alpha$  (KlGpa1p) tiene efectores río abajo (Sánchez-Paredes, E., *et al.*, en prensa) que le confieren una actividad positiva en la transducción del estímulo. Se ha observado que una mutante carente de KlGpa1p es viable y puede aparearse, aunque de manera deficiente (Saviñon-Tejeda, A.L. *et al.*, 2001).

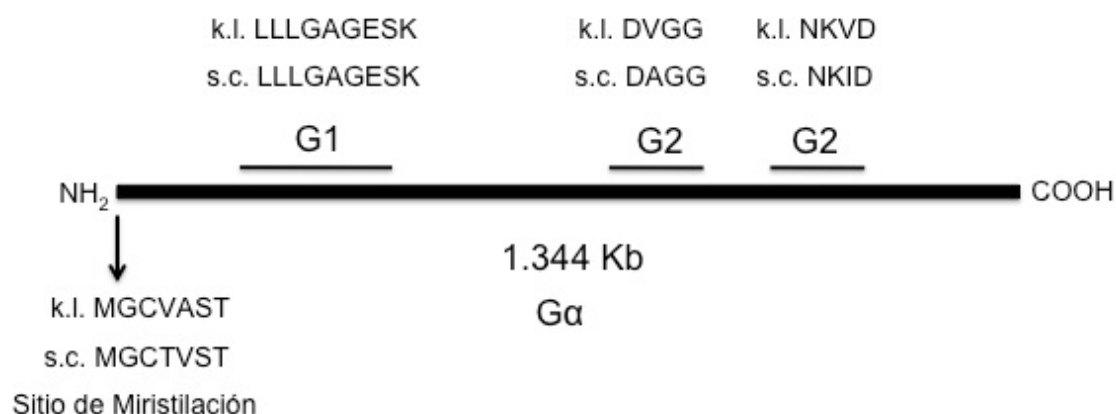


Figura 4. Esquema de la estructura primaria de la subunidad  $G\alpha$ , en donde se muestran las regiones G1 y G2. Se muestra la secuencia nucleotídica conservada de estas regiones, s.c. para *S. cerevisiae*, y k.l. para *K. lactis*. (Modificado de Saviñon-Tejeda, A.L., *et al.*, 2001).

### 3.5. El dímero $G\beta/G\gamma$

Las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  se unen de manera no covalente para formar un complejo muy estable, de tal manera que actúan como una sola unidad funcional (figura 4). El heterodímero  $G\beta/G\gamma$  ayuda a estabilizar la forma  $G\alpha$  unida a GDP, y es capaz de activar efectores para transmitir la señal, tales como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa  $C\beta$  y algunos canales iónicos (Spiegel, A.M., *et al.*, 1994).

Los primeros estudios cristalográficos del dímero  $G\beta\gamma$  se hicieron por el grupo de Sprang (Wall, M.A., *et al.*, 1995) e independientemente por el grupo de Sigler

(Lambright, D.G., *et al.*, 1996). Estos grupos observaron que la subunidad G $\beta$  se pliega como una típica estructura de propela con 7 hélices formadas cada una por 4 hojas- $\beta$ . Su extremo amino-terminal está formado por una  $\alpha$ -hélice (Smrcka, A.V., 2008) (Figura 5).

La subunidad G $\beta$  está compuesta por 7 segmentos de secuencias similares entre sí y están ordenadas en tándem (Van der Voorn, L. y Ploegh, H. L., 1992). Estos motivos repetidos se conocen como WD-40 y dividen a la subunidad G $\beta$  en 8 partes, mientras que el extremo amino-terminal es una región muy variable, los otros 7 segmentos tienen motivos WD-40 completos (Coria, R., *et al.*, 1996; Van der Voorn, L. y Ploegh, H. L., 1992).

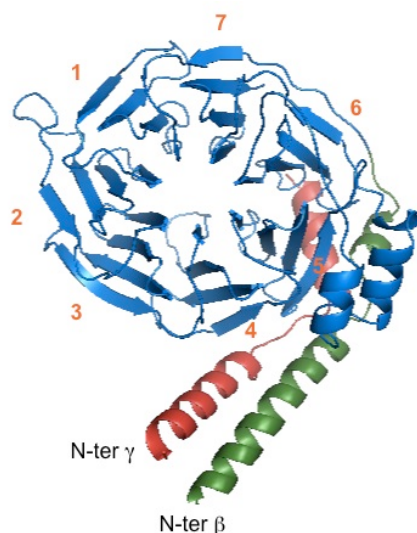


Figura 5. Estructura del dímero G $\beta$ /G $\gamma$ . En azul se muestra la subunidad G $\beta$ , en rojo la subunidad G $\gamma$ , en verde se muestra el extremo amino-terminal de G $\beta$  que interacciona con G $\gamma$  para formar una hélice super-enrollada (coiled-coil). Los números indican el orden de las propelas de G $\beta$ . (Modificado de Smrcka, 2008).

La subunidad G $\gamma$  tiene una estructura muy sencilla, está formada por dos  $\alpha$ -hélices. Una característica particular de la subunidad G $\gamma$  es el motivo CCAAX en el extremo carboxilo-terminal, formado por dos residuos de cisteína “C”, dos residuos de aminoácidos no polares alifáticos “A” y un último residuo que puede ser cualquiera “X”. Este motivo CCAAX es el blanco para modificaciones post-traduccionales de tipo prenilación, que consiste en la adición de un grupo hidrofóbico prenilo (Magee, T., y Marsahall, C., 1999). Estos grupos prenilo pueden ser de dos tipos: farnesilo o geranilo. La adición de uno u otro grupo está definida por el último residuo de aminoácido del

motivo CCAAX, es decir por la posición “X”. Cuando hay residuos de metionina, alanina, serina, cisteína o glutámico en la posición “X” se adiciona un farnesilo, pero cuando los residuos son leucina o fenilalanina entonces se añade un grupo geranilo (Whiteway, M., y Thomas, D., 1994; Grishin, A., *et al.*, 1994; Chinault, S., y Blumer, K., 2003). Después de la adición del grupo isoprenilo en la cisteína del CCAAX, una proteasa (Rce1) degrada los últimos 3 aminoácidos de G $\gamma$  (AAX). Después de esto una isoprenil-cisteína-carboxy-metil transferasa (Icmt) cataliza la metilación del nuevo extremo carboxilo-terminal de G $\gamma$  (Takida, S., y Wedegaertner, P.B., 2003; Smrcka, A.V., 2008).

### **Las hélices superenrolladas (Coiled Coils)**

Las subunidades G $\beta$  y G $\gamma$  se unen entre sí formando un heterodímero, a través de una estructura muy estable conocida como hélice superenrollada o estructuras coiled-coil en inglés (figura 5). Estas estructuras están formadas por dos  $\alpha$ -hélices que se pliegan una sobre la otra. En el caso del dímero G $\beta$ /G $\gamma$ , los primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de G $\beta$  forman una  $\alpha$ -hélice que a su vez se pliega sobre el extremo amino-terminal de G $\gamma$  que también es una  $\alpha$ -hélice (Gaudet, R., *et al.*, 1996; Sondek, J., *et al.*, 1996; Smrcka, A.V., 2008). En las hélices superenrolladas participan héptadas (*abcdefg*) de residuos de aminoácidos que pueden repetirse varias veces. En las posiciones *a* y *d* se encuentran residuos alifáticos o aromáticos que crean una cara hidrofóbica a lo largo de cada  $\alpha$ -hélice (Figura 6), generando una superficie para la interacción. En las posiciones *e* y *g* hay residuos cargados que forman puentes iónicos entre las hélices, dándole estabilidad a la estructura (Spiegel, A.M., *et al.*, 1994; Lupas, A., *et al.*, 1991).

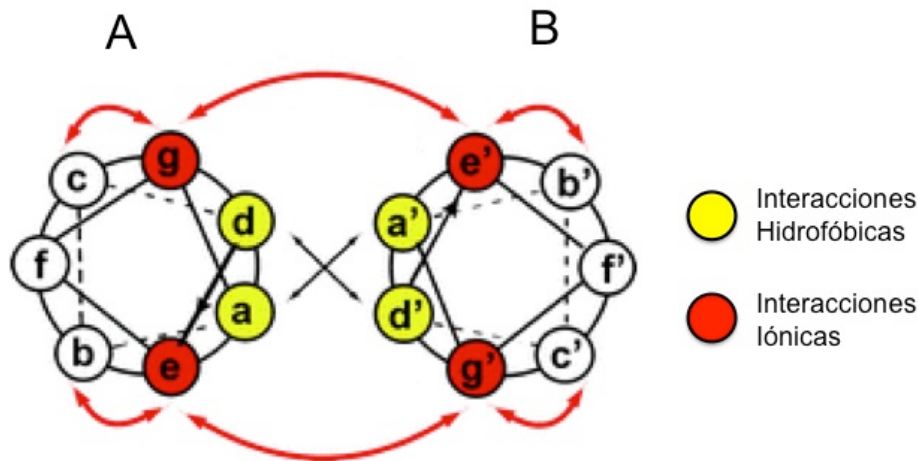


Figura 6. Esquema de las interacciones tipo Coiled-coil o hélices superenrolladas. A y B representan las hélices- $\alpha$  que participan en la formación de la hélice superenrollada. Con letras minúsculas se representan las posiciones que ocupan los residuos de aminoácidos en la héptada de cada  $\alpha$ -hélice que participa en la formación de la estructura. En color rojo se indican los residuos de aminoácidos que tienen interacciones iónicas y las flechas rojas muestran el residuo con el que interactúan, en la hélice- $\alpha$  A el residuo "g" interactúa con "e" de la hélice- $\alpha$  B, y con el residuo "c" de su misma hélice. En color amarillo se indican los residuos que presentan interacciones hidrofóbicas, la posición "a" de la hélice- $\alpha$  A interactúa con la posición "d" de la hélice- $\alpha$  B. Modificado de bCIPA [www.molbiotech.uni-freiburg.de/bCIPA/](http://www.molbiotech.uni-freiburg.de/bCIPA/).

### El tráfico y ensamblaje del dímero $G\beta\gamma$

Las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  de la proteína G son proteínas unidas a la membrana plasmática, por tanto, es importante que se encuentren bien localizadas para que puedan realizar su función. Pero ni  $G\beta$  ni  $G\gamma$  tienen dominios hidrofóbicos que los lleven a la membrana plasmática, y se sintetizan en el citoplasma. Entonces, su localización en la membrana depende de la modificación lipídica post-traducciona de la subunidad  $G\gamma$ .

Recientemente se han identificado las chaperonas que se requieren para el plegamiento de estas dos subunidades que forman el dímero  $G\beta\gamma$ . Para la subunidad  $G\beta$  se requieren dos chaperonas, el complejo CCT1 (también conocida como TRiC), que se une a la subunidad  $G\beta$  recién sintetizada y promueve su plegamiento en  $\beta$ -propela (Smrcka, A.V., 2008), y PhLP una proteína que actúa como co-chaperona de CCT1. Una vez que  $G\beta$  se ha plegado correctamente, CCT1 se disocia, pero PhLP permanece unida (Lukov, G.L., *et al.*, 2005). Para el plegamiento de la subunidad  $G\gamma$  se requiere de



---

una chaperona conocida como Dopamine Receptor-Interacting protein 78 (DRiP78), la cual se une a G $\gamma$  y a PhLP unido a G $\beta$ , por lo que también se requiere para el correcto ensamblaje de la subunidad G $\beta$  con la subunidad G $\gamma$  (Lengeler, K., *et al.*, 2000; Smrcka, A.V., 2008). DRiP es una chaperona que se localiza en el retículo endoplásmico, por lo que se sugiere que al menos la parte inicial del ensamblaje del dímero G $\beta\gamma$  se lleva a cabo en este organelo (Lukov, G.L., *et al.*, 2006).

Una vez que el dímero G $\beta\gamma$  se ha ensamblado, entonces el segmento CCAAX de G $\gamma$  sufre la prenilación descrita anteriormente. Posterior a esto, ocurre el ensamblaje con la subunidad G $\alpha$ , la cual es muy importante para la correcta localización del dímero en la membrana plasmática y en la vecindad del receptor GPCR, ya que en ausencia de la subunidad G $\alpha$ , el dímero puede localizarse en la membrana de otros organelos o incluso en el mismo retículo endoplásmico (Smrcka, A.V., 2008).

### **El dímero G $\beta$ /G $\gamma$ en las levaduras**

En *S. cerevisiae* y en *K. lactis* existe una sola copia de los genes que codifican para las subunidades G $\beta$  (Ste4p) y G $\gamma$  (Ste18p). Ambas se asocian a la subunidad Gpa1p (G $\alpha$ ) para formar la única proteína G heterotrimérica en estas levaduras. En respuesta a feromonas el dímero G $\beta$ /G $\gamma$  activa la cascada de señalización formada por MAPK a través de interacciones proteína-proteína (Whiteway, M., *et al.*, 1989; Coria, R., *et al.*, 1996; Kawasaki, L., *et al.*, 2005; Coria, R., *et al.*, 2006).

### 3.6. La vía de respuesta a feromonas de apareamiento

Como se mencionó anteriormente, las levaduras pueden dividirse vegetativamente o aparearse y reproducirse sexualmente. En levaduras como *S. cerevisiae* y *K. lactis* hay dos tipos celulares haploides, MAT $\alpha$  y MATa, que secretan al medio feromonas peptídicas que estimulan a la célula del tipo celular contrario para aparearse. Cada célula haploide expresa receptores (GPCRs) que son específicos para la feromona del tipo celular contrario, es decir, las células MATa secretan al medio feromonas-a y expresan receptores Ste2p sensibles a la feromona- $\alpha$ ; las células MAT $\alpha$  secretan feromonas- $\alpha$  y expresan receptores Ste3p sensibles a feromonas-a.

En *S. cerevisiae*, una vez que la feromona se ha asociado al receptor correspondiente, Gpa1p (G $\alpha$ ) tiene cambios conformacionales que inducen el intercambio de GDP por GTP, lo que libera al dímero Ste4p/Ste18p (G $\beta$ /G $\gamma$ ). El dímero puede unirse a sus efectores río abajo y así transmitir el estímulo de la feromona (figura 7). Los efectores más conocidos del dímero que se conocen son:

-Cdc24p que es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de Cdc42p que 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. Cdc24p participa también en reclutar a la proteína de andamiaje Ste5p y en la unión de ésta con Ste4p (Wang, Y., *et al.*, 2005).

-Ste20p es otro efector del dímero, pertenece a la familia PAK (proteín-cinasas activadas por p-21) y participa fosforilando a Ste11p<sup>MAPKKK</sup>, que es la primera cinasa del módulo (Leeuw, t., *et al.*, 1998).

-Ste5p es una proteína de andamiaje para las cinasas Ste11p<sup>MAPKKK</sup>, Ste7p<sup>MAPKK</sup> y Fus3p<sup>MAPK</sup>. Se le conoce como andamiaje porque sirve de anclaje para las tres MAP cinasas mencionadas y promueve la interacción entre éstas para que haya fosforilación eficiente de una a otra. Además mantiene a este modulo en la cercanía de Ste4p, haciendo más eficiente la señalización (Kang, Y.S., *et al.*, 1990; Clark, K.L., *et al.*, 1993).

---

En cuanto llega el estímulo de la feromona, el dímero  $G\beta/G\gamma$  se disocia de  $G\alpha$  y se une a Ste20p, que será activada por Cdc42p. Una vez activada, Ste20p fosforila a Ste11p, lo cual desencadena la señalización y termina con la fosforilación de Fus3p (La vía de respuesta a feromona de *K. lactis* se presenta en la figura 7).

La cinasa Fus3p, una vez fosforilada, activa a Ste12p, que es un factor transcripcional que permite la expresión de genes necesarios para el apareamiento. Entre otros efectos, se induce el arresto del ciclo celular, la formación del “shmoo” y finalmente la fusión de la célula con otra del tipo celular opuesto.

Como se mencionó anteriormente,  $G\alpha$  (Gpa1p en *S. cerevisiae*) tiene un papel negativo en el sistema, es decir, se une al dímero  $G\beta/G\gamma$  (Ste4p/Ste18p) para formar el heterotrímero, deteniendo así la transducción de la señal. Una mutante carente de  $G\alpha$  (Gpa1p) es letal, mientras que mutantes carentes de  $G\beta$  (Ste4p) o  $G\gamma$  (Ste18p) son viables, pero estériles (Kang, Y.S., *et al.*, 1990; Whiteway, M., *et al.*, 1992, Whiteway, M., *et al.*, 1989).

En la levadura *K. lactis* se han encontrado varias de las proteínas participantes en la vía de respuesta a feromonas y se ha observado gran similitud con sus homólogos en *S. cerevisiae*. Lo que ha llamado nuestra atención es el mecanismo de acción de la proteína G, que presenta diferencias notables con el de *S. cerevisiae*.

La subunidad  $G\alpha$  (KlGpa1p en *K. lactis*) participa activando efectores río abajo. Saviñon-Tejeda y col. (2001) demostraron que una mutante nula para  $G\alpha$  (KlGpa1p) es viable y se aparee de manera parcial, lo que sugiere que  $G\alpha$  es necesaria para que el apareamiento sea completamente eficiente. Se ha encontrado que  $G\alpha$  (KlGpa1) se une a KlSte50p, una proteína adaptadora, que a su vez se une a la cinasa KlSte11p, mejorando así el reclutamiento de las proteínas en la cercanía de KlSte4p (Sánchez-Paredes, E., *et al.*, en prensa).

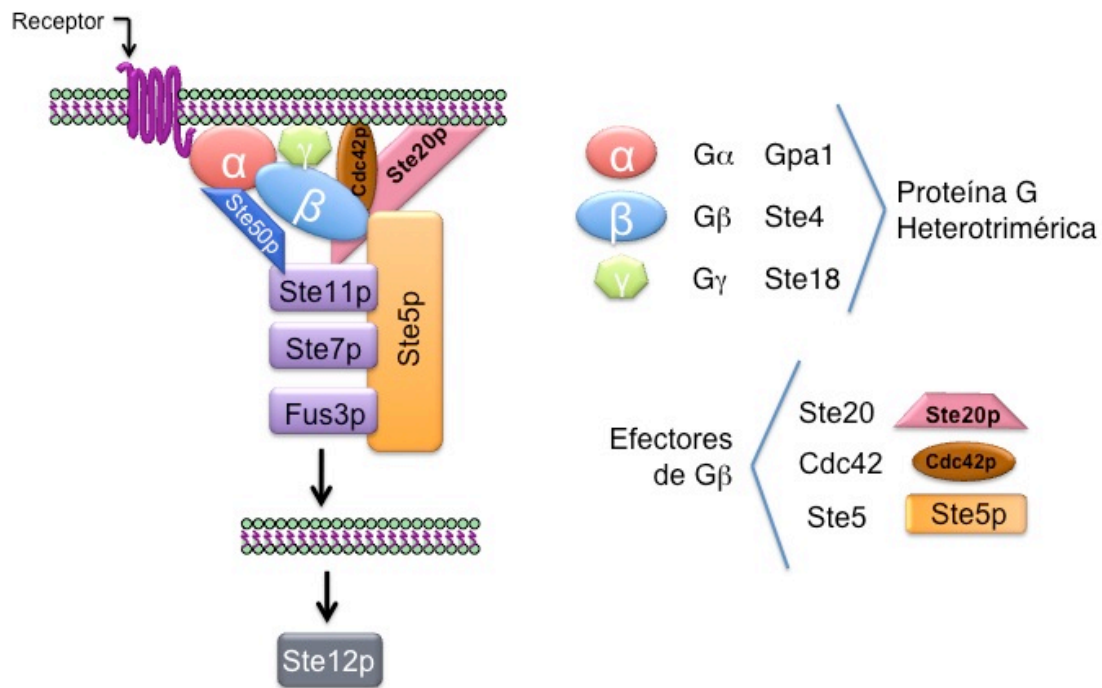


Figura 7. Esquema de la vía de respuesta a feromonas en la levadura *K. lactis*. Se muestra la subunidad  $G\alpha$  en color rojo,  $G\beta$  en azul y  $G\gamma$  en color verde. El módulo de MAP cinasas se muestra de color morado, mientras que la proteína de andamiaje Ste5p de color naranja. En color rosa el efector Ste20p y en color azul marino la proteína Ste50p que se considera es un efector de la subunidad  $G\alpha$ . En color púrpura se muestra el receptor.

Otra diferencia importante es el papel de la subunidad  $G\gamma$  (KlSte18p) en esta vía de señalización. Se sabe que una cepa carente de  $G\gamma$  es capaz de aparearse (Navarro-Olmos, R., 2006). Haremos una descripción amplia de estos resultados más adelante.

El resto de las proteínas participantes en la vía parecen conservar su función, como los receptores KlSte2p y KlSte3p (Torres-Quiroz, F., *et al.*, 2007). El módulo de MAP cinasas se ha identificado, y aunque faltan estudios acerca de su función, los fenotipos de las mutantes nulas se conservan entre *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Coria, R., *et al.*, 2006)

## La subunidad $G\gamma$ no es necesaria para el apareamiento

En trabajos previos observamos que una mutante nula de la subunidad  $G\gamma$  en *K. lactis* es fértil (Navarro-Olmos, R., 2006). Esta observación, como se discutirá posteriormente, es muy interesante ya que se ha reportado que la subunidad  $G\gamma$  de la proteína G heterotrimérica en *S. cerevisiae* es indispensable para la respuesta al estímulo de la feromona; el fenotipo de una mutante  $\Delta ste18$  es de completa esterilidad, porque la vía de señalización del apareamiento no puede ser activada (Coria, R., *et al*, 1996).

En *S. cerevisiae*  $G\gamma$  sufre una modificación lipídica post-traducciona que le permite al dímero  $G\beta/G\gamma$  anclarse en la membrana plasmática y asociarse con  $G\alpha$  y así responder al estímulo de la feromona. Sin  $G\gamma$  la subunidad  $G\beta$  no puede localizarse en este organelo y no será capaz de reclutar al módulo de las MAP cinasas río abajo. Sin embargo, en *K. lactis* la ausencia de  $G\gamma$  no afecta el apareamiento, lo que sugiere que la subunidad  $G\beta$  se asocia a la membrana y que el módulo de MAP cinasas se recluta correctamente.

El grupo de Grishin, y col., reportó en 1994, que en *S. cerevisiae* una sustitución de la segunda cisteína por una serina en el motivo CCAAX de la subunidad  $G\gamma$  tiene fenotipo de esterilidad total, aún en un fondo con la  $G\gamma$  silvestre. Es decir, que la subunidad mutante  $G\gamma^{S109}$ , en competencia con la  $G\gamma$  silvestre, tiene un fenotipo dominante, secuestrando a la subunidad  $G\beta$  y evitando que esta última se localice en la membrana, por lo que el estímulo de la feromona no puede ser transmitido y las levaduras no pueden aparearse. Por tanto, el fenotipo de la mutante  $G\gamma^{S109}$  es dominante negativo.

En *K. lactis* se realizó un ensayo similar, sustituyendo la cisteína 87 ( $G\gamma^{S87}$ ) del motivo CCAAX, por una serina. Se hicieron ensayos de apareamiento con ésta mutante en cepas con fondo genético silvestre, para observar la competencia entre  $G\gamma^{S87}$  y  $G\gamma$  silvestre, similar a la reportada por Grishin, A., y col. (1994). Pero se observó que las células de *K. lactis* seguían apareándose de manera normal, contrario a lo mostrado en *S. cerevisiae*. Estos resultados indican que el fenotipo de  $G\gamma^{S87}$  en *K. lactis* no es

---

dominante, y sugieren que la subunidad  $G\beta$  se encuentra localizada en la vecindad del receptor, debido probablemente a la subunidad  $G\gamma$  silvestre.

Se realizaron ensayos de apareamiento con la mutante  $G\gamma^{S87}$  en un fondo genético  $\Delta G\gamma$  (en *K. lactis*), para determinar si la subunidad  $G\beta$  seguía siendo capaz de localizarse correctamente. Se observó que el fenotipo de la cepa  $\Delta G\gamma + G\gamma^{S87}$  sigue siendo fértil. Se esperaba que al competir con la subunidad  $G\gamma$  silvestre, la  $G\gamma^{S87}$  secuestrara a la subunidad  $G\beta$ , manteniéndola en el citoplasma e interrumpiera así la señalización del estímulo de la feromona, por lo que las células serían estériles. Sin embargo, al realizar el ensayo se observó que las levaduras se apareaban de manera normal, lo que indica que la modificación lípida de  $G\gamma$  no es esencial para responder a la feromona en *K. lactis*.

Estas observaciones confirman lo observado en el apareamiento con la mutante  $\Delta G\gamma$  en *K. lactis*. Ambos resultados sugieren que la subunidad  $G\gamma$  no es esencial para el funcionamiento de la proteína G heterotrimérica que responde a feromona en *K. lactis*. Por eso es importante determinar como se activa la proteína G de esta levadura, y como puede transducir la señal de la feromona a través de la cascada de MAP cinasas, en ausencia de  $G\gamma$ .

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El fenotipo de las mutantes de la proteína G de *K. lactis* es diferente al fenotipo de las mutantes de la misma proteína de *S. cerevisiae*. Más aún, el fenotipo de la mutante de la subunidad G $\gamma$  es diferente a lo descrito en los organismos en los que se ha estudiado. Es interesante la dispensabilidad de esta subunidad, ya que, según lo que se ha reportado, es responsable de localizar a la subunidad G $\beta$  en la membrana plasmática, y sin esta subunidad la señalización no puede darse.

Estos datos indican que la proteína G heterotrimérica de *K. lactis* tiene un mecanismo de activación diferente al descrito para otros organismos. Por esto es importante estudiar cómo se activa y cómo modula la respuesta a las feromonas.

## **5. HIPÓTESIS**

Si en ausencia de la subunidad  $G\gamma$ , la proteína G puede seguir modulando la respuesta al estímulo de la feromona, entonces esto indica que la subunidad  $G\beta$  se localiza en la membrana plasmática y es funcional. Lo que sugiere que se ancla en la vecindad del receptor y se acopla a éste, a través de la subunidad  $G\alpha$ .

## **6. OBJETIVO**

El objetivo general de este trabajo es entender por qué una cepa mutante carente de la subunidad  $G\gamma$  es fértil en la levadura *K. lactis*.



## 7. MATERIALES

### 7.1. Cepas

Las cepas que utilizamos en este trabajo son las siguientes:

*Kluyveromyces lactis*.

155. MAT $\alpha$ , ade2, his3, ura3.

12/8. MAT $\alpha$ , argA, lysA, ura3.

*Saccharomyces cerevisiae*.

EGY48. MAT $\alpha$ , his3, trp1, ura3-52, leu2::pLeu-LexAop6. Esta cepa se utilizó para los ensayos de doble híbrido.

*Escherichia coli*

DH5 $\alpha$ . Utilizada para la propagación de los plásmidos empleados en este trabajo.

### 7.2. Medios

YPD. Medio rico para levaduras. 1% de extracto de levaduras, 2% de glucosa, 2% de bactopectona y 2% de agar.

YPGal. Contiene los mismos ingredientes que YPD, pero tiene 2% de galactosa en lugar de glucosa.

SD. Medio mínimo. 0.67% de bases nitrogenadas sin aminoácidos, 2% de glucosa y 2% agar. Para la selección de plásmidos, se adicionaron los aminoácidos necesarios a una concentración de 50  $\mu$ g/ml. Para selección negativa de URA3, se añadió uracilo 2mg/ml y ácido fluoroorotico (5-FOA) 1 mg/ml.

SGal. Contiene los mismos ingredientes que SD, pero tiene 2% de galactosa en lugar de glucosa.

Medio mínimo de esporulación. Se utilizó para favorecer la esporulación de diploides. Acetato de potasio 1% y Agar 2%.

LB- ampicilina. Para la propagación de plásmidos en bacterias. Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Bacto-triptona 1% y Agar 2%.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Generación de mutantes y construcciones.

Interrupciones de Genes. La interrupción del gen *Klste18* ( $KIG\gamma$ ) se realizó en trabajos previos (Navarro-Olmos, R., 2006). Las interrupciones de los genes *Klspa1* ( $KIG\alpha$ ) y *Klste4* ( $KIG\beta$ ) se describieron previamente (Saviñon-Tejeda, A.L., *et al.*, 2001; Kawasaki, L., *et al.*, 2005).

Las dobles mutantes  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$  y  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$  se obtuvieron por apareamiento de las mutantes sencillas. Antes del apareamiento, se cultivó la mutante sencilla  $\Delta KIG\gamma$  en medio SD-FOA para la selección negativa de cepas  $\Delta KIG\gamma::URA3$ . Se realizó el apareamiento con esta mutante sencilla y la mutante  $\Delta KIG\alpha$ ; las diploides obtenidas se cultivaron en medio mínimo de esporulación. Una vez que esporularon se seleccionaron las cepas dobles mutantes en medio mínimo SD-URA. Para las dobles mutantes  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$ , la mutante  $\Delta KIG\beta$  se transformó con una copia de *KISTE4* silvestre en plásmido (YEpKDGal-His) ya que la mutante  $\Delta KIG\beta$  es estéril, después se realizó el apareamiento con  $\Delta KIG\gamma::URA3$ . Las dobles mutantes se seleccionaron en medio mínimo SD-URA. Las dobles mutantes elegidas se confirmaron por Southern blot.

YEpKD-KISTE4. *KISTE4* se clonó en el plásmido YEpKD como se describió previamente (Kawasaki, L., *et al.*, 2005).

YEpKD-HA-KISTE4. Se utilizó la Hemaglutinina (HA) como epítopo para la inmunodetección de *KISTE4*. Por PCR se amplificó HA con los siguientes cebadores: Cebador directo 5' -CCCGGGATGTACCCATACGATGTTCTG- 3' que contiene un sitio de restricción *Sma*I (subrayado).

Cebador inverso

5' -TGCTGAATCGACTTCCATAGCGTAATCTGGAACG- 3' este cebador contiene 6 codones de la secuencia de *KISTE4* (subrayado). De esta manera se amplificaron 3 copias de HA usando como templado un plásmido que contenía estas secuencias. El producto de PCR obtenido se utilizó como cebador directo junto con el cebador inverso de *KISTE4*:

5' -TTTTTCGATATGCGGTACCATTCTCAGT- 3' que contiene el sitio de restricción *Asp718* (subrayado). Para este segundo PCR se utilizó como templado el plásmido YEpKDSTE4. El producto de PCR de 1434 pb se clonó en el plásmido pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido pTOPOKISTE4 fue digerido con las enzimas *Sma1* y *Asp718* y rellenado con Klenow para posteriormente clonarlo en el plásmido YEpKDGalHis previamente digerido con *EcoR1* y rellenado con Klenow, para obtener así la construcción YEpKD-HA-KISTE4.

KIG $\beta$ <sup>R130</sup>. Por PCR se amplificó un fragmento de 366 pb de KISTE4 con los siguientes oligodeoxinucleótidos:

Cebador directo +35 ACAGGAACTGATTGTGC +51; Cebador inverso +401 GCTACTCAAGACCCGTTGGGATAACAA +375 este primer introduce C en lugar de T en la posición +387 (subrayado) lo que implica la substitución de Trp130 por Arg. El producto de este PCR se utilizó como cebador directo para una segunda reacción de PCR junto con el primer +704 ATTATGACCATATCG +690. El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pGEM-T-Easy. El plásmido pGEM-KISTE4R130 se digirió con *Nde1* y *Nco1* para obtener un fragmento de 369pb, que se ligó en la construcción YEpKD-HA-KISTE4 que fue previamente digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el plásmido YEpKD-HA-KLSTE4R130.

HAG $\beta$ -CAAX. Para añadir el CAAX a la subunidad KIG $\beta$  se realizó una reacción de PCR con el oligodeoxinucleótido:

5' -CCCGGG-TCACATTATGGTACAACAGGCACTCTGATGAACCGGTGT-3' que contiene un sitio de restricción *Sma1* (subrayado) y los últimos 24 nucleótidos de KISTE18 (cursivas) incluyendo el codón de STOP y los últimos 15 nucleótidos de KISTE4. Como templado se utilizó YEpKD-HA-KISTE4. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T-Easy, esta construcción contiene la secuencia que codifica para HA-KIG $\beta$  con los últimos 7 residuos de KIG $\gamma$  fusionada en su extremo C-terminal. Se hizo una digestión enzimática con *Sma1* y el producto se clonó en el plásmido YEpKDGal previamente digerido con *EcoR1* y rellenado con el fragmento Klenow. De esta manera que se obtuvo la construcción YEpKD-HA-KISTE4-CAAX.

## 8.2. Ensayos de apareamiento

El objetivo de estos ensayos es evaluar la capacidad de las células para aparearse. Se aparean cepas haploides de sexos contrarios que se complementen genéticamente. Como resultado del apareamiento se generan células diploides, la ausencia de diploides indicaría que al menos una de las cepas haploides que se utilizaron para el ensayo es estéril. Las cepas que se van a probar en el apareamiento se cultivan como parches por 24 hrs a 30°C en medio rico YPD sólido o en medio mínimo SD para el caso de las cepas que contienen plásmidos. Las cepas silvestre contra la que se realiza el apareamiento, se cultiva como un césped en medio YPD y también se dejan crecer por 24 hrs a 30°C. Una vez que se han crecido ambas cepas se pasan por replicación a medio YPD y se incuban toda la noche a 30°C para permitir que las células se apareen. En el apareamiento se generaran células diploides que se seleccionan por replicación en medio mínimo SD, y se dejan incubando 48 hrs a 30°C.

Para los apareamientos cuantitativos, se preparan cultivos líquidos en SD para las cepas con plásmidos o en YPD para las cepas silvestres, hasta que alcancen fase exponencial. Se cuenta un millón de células de cada cepa y se mezclan en YPD líquido para que se apareen toda la noche a 30°C, después se hacen diluciones y se plaquean en medio SD por 48 hrs.

## 8.3. Ensayos de doble híbrido

Los ensayos de doble híbrido se realizaron con el sistema LexA-B42 previamente descrito (Ongay-Larios, L., *et al.*, 2000). La construcción K1STE18-pEG202 fue descrita previamente (Navarro-Olmos, R., 2006). También las construcciones K1GPA1 y K1STE4 en los plasmidos pEG202 y pJG4.5 ya han sido reportadas en trabajos previos (Kawasaki, L., *et al.*, 2005). Para la construcción K1STE4R130-pJG4.5, hicimos digestión enzimática con *Xho1* y *Nco1* del plásmido pGEMK1STE4R130, el fragmento obtenido de 350 pb fue sustituido en el plásmido pJG4.5-K1STE4, previamente digerido con las mismas enzimas. Como control negativo de interacción utilizamos el gen de endoquitinasa (CTS1) de *S. cerevisiae* en el plásmido pEG202 y en el pJG4.5 (Ongay-Larios, L., *et al.*, 2000). La interacción de las

proteínas fue determinado por expresión del gen reportero LACZ que se encuentra en el plásmido pSH18.34 (Ongay-Larios, L., *et al.*, 2000).

Se transformó la cepa EGY48 con los plásmidos de doble híbrido, incluyendo el reportero, las cepas transfectadas se plaquearon en medio SD y se dejaron crecer 48 hrs a 30°C. Una vez que crecieron las colonias se seleccionaron algunas de ellas y se crecieron en medio SGal con 1mg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopiranosido) se incubaron por 24 hrs a 30°C y evaluó la coloración azul de las colonias.

Para hacer un estimado cuantitativo de la interacción de las proteínas se midió la actividad del gen reportero por ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa Esta puede ser medida empleando sustratos que al ser hidrolizados se descomponen en compuestos de cierto color como el ONPG (O-nitrophenil-B-D-Galactosido), que cuando es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa genera un compuesto de color amarillo (Miller, J.H., 1992). En trabajos previos se ha descrito la metodología (Ongay-Larios, L., *et al.*, 2000).

#### **8.4. Fraccionamiento celular**

Las células se inoculan en medio YPGal y se dejan crecer a 30°C hasta la fase exponencial. Se recuperan las células y se lavan 2 veces con amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.5 y se resuspenden en amortiguador A (Tris 50mM, pH7.5, sorbitol 1M, EDTA 1mM) y se añade 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se lava una vez más, y se añaden 500 U/g de Lyticasa y se incuba a 30°C por 2 hrs para formar esferoplastos. Se añade PMSF y se sonica 4 veces por 1 minuto con intervalos de 30 segundos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 3,000 X g se recupera el sobrenadante y se centrifuga por 30 minutos a 100,000 X g a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 100,000 X g 45 minutos también a 4°C. El botón se resuspende en amortiguador EGTA, y se centrifuga nuevamente a 100,000 X g por 45 minutos a 4°C. El botón se resuspende nuevamente en amortiguador EGTA y se almacena a -70°C.

## 8.5. Ensayos de inmunodetección

Las muestras de proteínas se corrieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE y posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nylon (Millipore, Bedford, MA). Antes de incubar con el anticuerpo, las membranas se bloquearon con leche al 5% en amortiguador PBS y Tween 20 al 0.05% durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos se resuspendieron en amortiguador PBS y se dejaron incubando una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Zymed, South San Francisco, CA) se incubó también por una hora. Posteriormente la membrana se trató con sustrato quimioluminiscente HRP (Millipore).

## 8.6. Modelado de proteínas

El heterotrímero  $G\alpha\beta\gamma$  de *K. lactis* fue modelado con base en las coordenadas del trímero cristalizado  $G\alpha1\beta1\gamma2$  (1GP2) de mamífero (Wall, M.A., *et al.*, 1995), y utilizamos el modelo del heterotrímero de *S. cerevisiae* de la base de datos de RCSB Protein Database (1SCG) (Gaitatzes, C.G *et al.*, 1998). El modelado de las subunidades se hizo con Modeller 9v4 (Marti-Renom, M.A., *et al.*, 2000) aunque algunas de las secuencias fueron revisadas manualmente. Los modelos fueron evaluados con Molprobit (Lovell *et al.*, 2003) y la minimización de energía de los mismos se hizo con Chimera (Pettersen, E.F., *et al.*, 2004). Los modelos y las imágenes que se presentan fueron visualizadas con PyMOL (<http://www.pymol.org>).







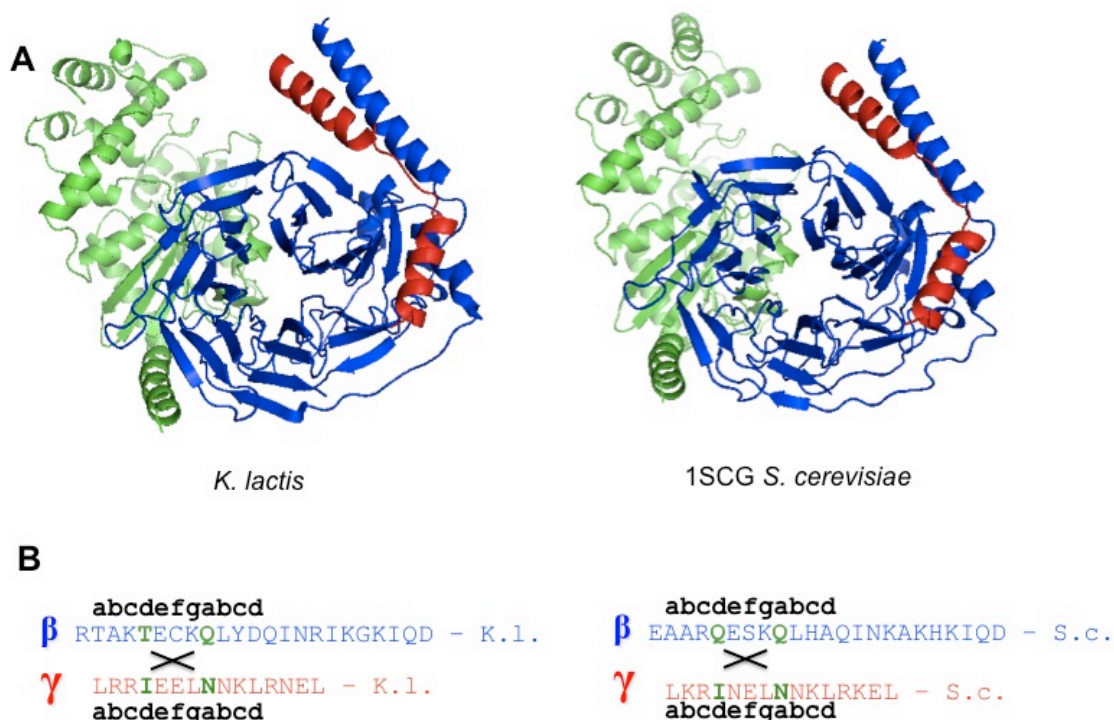


Figura 10. (A) Modelo de listón de la proteína G heterotrímica de *K. lactis* obtenida por homología con el modelo 1SCG de *S. cerevisiae*, en verde la subunidad  $G\alpha$ , en azul la subunidad  $G\beta$  y en rojo la subunidad  $G\gamma$ . (B) Alineamiento de las secuencias que participan en la interacción coiled-coil, en azul la secuencia de la subunidad  $G\beta$ , en rojo la secuencia de la subunidad  $G\gamma$ , en negro se indican las posiciones que ocupan los residuos de aminoácidos en la héptada del coiled-coil; en color verde, se indican los residuos de aminoácidos que participan en la interacción de  $G\beta$  con  $G\gamma$ , que ocupan las posiciones a y d (K.l., *K. lactis*; S.c., *S. cerevisiae*).

Se observa que la estructura terciaria de las tres subunidades está muy conservada con respecto a la estructura de la proteína G heterotrímica de *S. cerevisiae*. Las subunidades de *K. lactis* conservan la estructura típica de esta familia de proteínas, en particular la subunidad  $G\gamma$  (Figura 10. Panel A). La estructura modelada se refinó y se evaluó con el programa Molprobity (Lovell et al., 2003) con un puntaje de 2.71 (MolProbity score).

Se realizó también la de predicción de secuencia que forman hélices superenrolladas (coiled-coils) en las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  de *K. lactis*. Para cumplir este objetivo se utilizó el programa Socket (Walshaw, J., y Woolfson, D.N., 2001). Se predijo por lo menos una héptada completa de residuos de aminoácidos que participan en estructuras superenrolladas tanto en las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  de *K. lactis*, como en las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  de *S. cerevisiae* (Figura 10. Panel B). Además, como puede

observarse en el alineamiento, estas secuencias que forman hélices superenrolladas están altamente conservadas entre las dos especies de levaduras. En el caso de G $\beta$  hay un cambio en la posición *d* de la héptada, en *S. cerevisiae* esta posición la ocupa un residuo de glutamina (N), mientras que en *K. lactis* hay una treonina (T); sin embargo, ambos residuos son polares y la interacción con asparagina (N) en G $\gamma$  se conserva. En G $\gamma$  los residuos que participan en la interacción con G $\beta$  son los mismos entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*, el único cambio es en la posición *e*, en donde una asparagina (N) en *S. cerevisiae* se cambia por un glutámico (E) en *K. lactis*. A pesar de estas diferencias, con el programa Socket se predice la formación de estructura superenrollada en *K. lactis* (<http://www.jic.ac.uk/staff/john-walshaw/socket.html>).

## 9.2. Análisis de las interacciones entre las subunidades de la proteína G heterotrimérica.

Se observó que KIG $\beta$  y KIG $\gamma$  tienen secuencias altamente conservadas con respecto a las secuencias de *S. cerevisiae* y que tienen los elementos estructurales necesarios para interactuar. Sin embargo, debido a los fenotipos observados, existe la posibilidad de que *in vivo* no interactúen. Es por esto que realizamos ensayos de interacción por el método de doble híbrido, para determinar la interacción física entre las subunidades KIG $\beta$  y KIG $\gamma$ .

El ensayo consistió en fusionar el dominio de unión a DNA LexA a la subunidad KIG $\gamma$  bajo el control del promotor *Adh1*, y fusionar el dominio de activación de la transcripción a la subunidad KIG $\beta$  bajo el control del promotor *Gall1*. Ambas construcciones se transfectaron junto con un vector reportero que contiene *LacZ*. Este reportero permitió seleccionar colonias de color azul, que son las que contienen al reportero activo, de tal manera que se pudo hacer una evaluación cualitativa de la interacción que hay entre las subunidades KIG $\beta$  y KIG $\gamma$ , comparando la intensidad del color de las colonias obtenidas contra el control positivo y el control negativo. También se pudo hacer una evaluación más precisa cuantificando la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 11). Como control positivo se utilizaron KIG $\alpha$  y KIG $\beta$ , las cuales interactúan fuertemente, y como control negativo se utilizó a la endoquitinasa, una proteína que no

tiene relación con el sistema y que se ha demostrado que no tiene interacción con ningún componente de la proteína G heterotrimérica (Ongay-Larios, L., *et al.*, 2000).

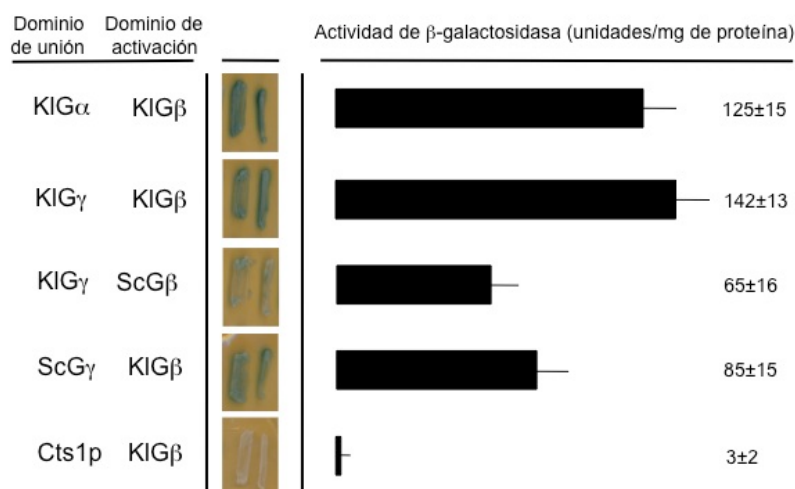


Figura 11. La subunidad KIG $\gamma$  interacciona con la subunidad KIG $\beta$ . Se muestran ensayos de interacción por el método de doble híbrido. El prefijo KI para las subunidades de *K. lactis*; el prefijo Sc para las subunidades de *S. cerevisiae*. Los plásmidos utilizados en este ensayo se insertaron en la cepa EGY48 de *S. cerevisiae*. Se eligieron al menos dos clones de cada transformante y se crecieron en medio SGal adicionado con XGal, se dejaron incubando 24 hrs a 30°C. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes.

Por medio de este ensayo observamos que hay una fuerte interacción entre la subunidad KIG $\beta$  y KIG $\gamma$ . En la figura 11 se muestra la interacción heteróloga entre las subunidades KIG $\beta$  (*K. lactis*) y G $\gamma$  (*S. cerevisiae*) y las subunidades KIG $\gamma$  (*K. lactis*) y G $\beta$  (*S. cerevisiae*), lo que sugiere que estas subunidades conservan los elementos estructurales necesarios para la formación del dímero G $\beta$ /G $\gamma$  en ambas especies. Sin embargo, ni KIG $\beta$  ni KIG $\gamma$  pudieron complementar el fenotipo de esterilidad de las mutantes  $\Delta$ G $\beta$  o  $\Delta$ G $\gamma$  en *S. cerevisiae*, lo que sugiere que el mecanismo de activación de la proteína G en *K. lactis* es diferente al de *S. cerevisiae* (datos no mostrados).

### 9.3. Análisis del fenotipo de las mutantes de la proteína G.

Los resultados previos indicaron que KIG $\beta$  se asocia a KIG $\gamma$ . Dado que es muy importante que G $\beta$  se localice en la membrana para activar a sus efectores, entonces se sugiere que hay otra proteína que puede localizar correctamente a G $\beta$  en ausencia de G $\gamma$ , y por eso puede haber apareamiento en las mutantes  $\Delta$ Klste18.

Se realizaron entonces ensayos de apareamiento con mutantes dobles  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$ . Se esperaba que estas dobles mutantes fueran estériles, ya que  $KIG\beta$  es incapaz de localizarse en la membrana en ausencia de las subunidades  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$ .

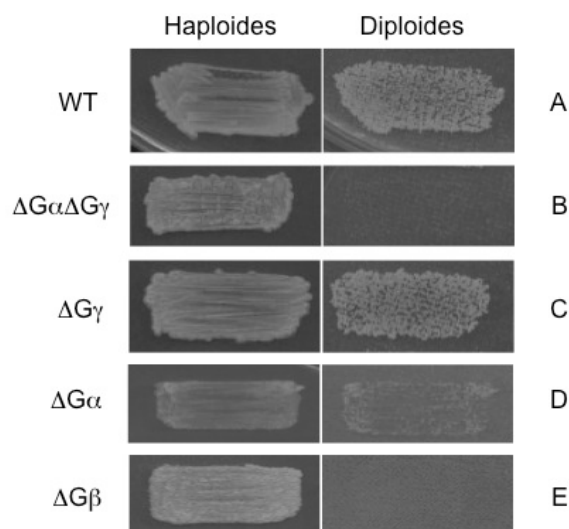


Figura 12. La doble mutante  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$  es estéril. Se muestran ensayos de apareamiento de mutantes de la proteína G heterotrimérica de *K. lactis*. El apareamiento se realizó por replicación. La cepa silvestre haploide 155 (MATa) y las mutantes se replicaron en medio YPD en presencia de la cepa del sexo contrario 12/8 (MATα) se incubaron toda la noche a 30°C, al día siguiente se seleccionaron los diploides en medio SD, y se incubaron 48 horas a 30°C. Se muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes.

En la figura 12 se muestran ensayos de apareamiento en donde la aparición de células diploides permite evaluar si el proceso de apareamiento fue viable entre las cepas probadas. Se muestra en la primera línea (A) el crecimiento de células diploides como producto del apareamiento de cepas silvestres (WT). En la línea C, se muestra que el apareamiento de la mutante  $\Delta KIG\gamma$  genera células diploides, como en el caso de las cepas silvestres, por lo que tiene fenotipo fértil. En la línea D, se observa que la cepa mutante  $\Delta KIG\alpha$  es capaz de aparearse pero deficientemente. En la línea E, se muestra el producto del apareamiento de la cepa mutante  $\Delta KIG\beta$  que es completamente estéril. Cuando se eliminan simultáneamente  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$ , en la línea B, se observa que la cepa es completamente estéril, igual que una cepa  $\Delta KIG\beta$ , lo que indica que la subunidad  $KIG\beta$  es inactiva en la doble mutante  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$ . Por tanto,  $KIG\beta$  requiere de la presencia de alguna de las dos subunidades que conforman el resto del heterotrímico:  $KIG\alpha$  o  $KIG\gamma$ , para localizarse en la vecindad del receptor y así transducir el estímulo proveniente de la feromona.

Estos resultados indican que la subunidad KIG $\beta$  es funcional en ausencia de la subunidad KIG $\gamma$ , es la subunidad KIG $\alpha$  la que se requiere para localizarla correctamente y activar la respuesta de apareamiento.

#### 9.4. Estudio de la localización de KIG $\beta$ .

La localización de la proteína G heterotrimérica en la vecindad del receptor es muy importante para la activación de la vía de apareamiento. Esta localización se logra por las modificaciones post-traduccionales que tienen las subunidades G $\gamma$  y G $\alpha$ . La subunidad G $\beta$  no tiene modificaciones post-traduccionales, por lo que su localización en la membrana depende de la subunidad G $\gamma$ . Con base los resultados anteriores, se propone que en *K. lactis* no sólo la subunidad KIG $\gamma$  es responsable de la localización de KIG $\beta$  en la membrana, sino que KIG $\alpha$  también puede hacerlo.

Para determinar la localización de la subunidad G $\beta$ , se realizaron ensayos de inmunodetección en las fracciones membranal y citoplasmática de mutantes carentes de KIG $\gamma$ , y KIG $\alpha$  y KIG $\gamma$  (figura 13).

Para detectar a la subunidad KIG $\beta$  se utilizó una construcción en la que el epítotope de hemaglutinina se fusionó al extremo amino-terminal de KIG $\beta$ . La detección se logró con un anticuerpo anti-HA. Para detectar a la subunidad KIG $\alpha$  se utilizó el anticuerpo anti-GPA1 de *S. cerevisiae*. Esta subunidad se encuentra en la membrana, independientemente de la presencia de G $\beta$  o G $\gamma$ , gracias a su asociación con el receptor. Con el objetivo de identificar la fracción citoplasmática se utilizó un anticuerpo anti-HOG1 para detectar a Hog1p, una proteína de citoplasma que participa en la respuesta a estrés hiperosmótico.

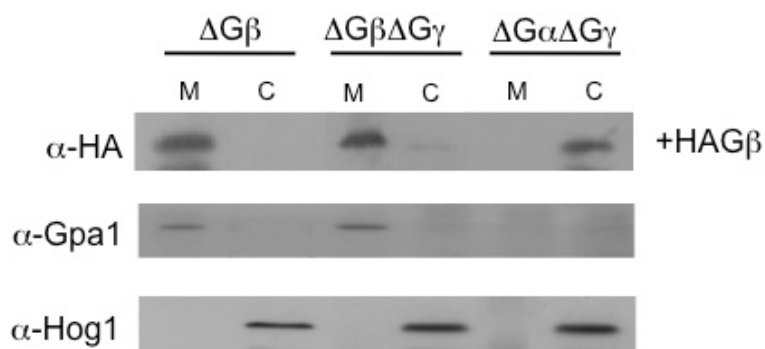


Figura 13. La subunidad KIHAG $\beta$  se localiza en el citoplasma en ausencia de las subunidades KIG $\alpha$  y KIG $\gamma$ . Se realizaron ensayos de inmunodetección de KIHAG $\beta$ . Las muestras se resolvieron en gel tipo SDS-PAGE al 10% y posteriormente fue analizado por hibridación tipo western. M es la fracción de membrana plasmática; C es la fracción citoplasmática.  $\alpha$ -Gpa1 y  $\alpha$ -Hog1, son los anticuerpos que utilizamos como controles de las fracciones de membrana y de citoplasma. Se muestra un ensayo representativo de tres ensayos realizados.

En cepas que carecen de KIG $\beta$  endógena (mutantes  $\Delta$ KIG $\beta$ ) transformadas con HAG $\beta$  se encontró que KIHAG $\beta$  se localiza en la misma fracción celular que KIG $\alpha$ , es decir que ambas migran en la fracción de membrana (figura 13). Esto se debe a que esta cepa contiene KIG $\gamma$  endógena.

En la doble mutante  $\Delta$ KIG $\gamma$ / $\Delta$ KIG $\beta$ , KIHAG $\beta$  se observa en la fracción de membrana, aunque se encuentra cierto porcentaje en la fracción citoplásmica. Este resultado sugiere que la subunidad KIG $\gamma$  ayuda a la subunidad KIG $\beta$  a localizarse en la membrana plasmática; sin embargo la subunidad KIG $\gamma$  no es indispensable para localizar a la subunidad KIG $\beta$ , ya que gran parte de KIG $\beta$  aún migra en la fracción membranal.

KIHAG $\beta$  se localizó solamente en la fracción citoplásmica en la doble mutante  $\Delta$ KIG $\alpha$ / $\Delta$ KIG $\gamma$ , igual que la proteína Hog1p. Estos resultados indican que en ausencia de KIG $\gamma$ , la subunidad KIG $\beta$  se mantiene en la membrana plasmática por su asociación con la subunidad KIG $\alpha$ , pero en ausencia de KIG $\alpha$  y de KIG $\gamma$ , KIG $\beta$  permanece en citoplasma (figura 13).

Estas observaciones son congruentes con lo que se observó en los experimentos de apareamiento, en los que se observa que KIG $\beta$  puede activar el apareamiento en presencia de KIG $\alpha$  o KIG $\gamma$ , pero no en ausencia de ambas (figura 12). En los ensayos de inmunodetección se mostró que KIG $\beta$  no se localiza en membrana en ausencia de KIG $\gamma$

y de  $KIG\alpha$ , lo que explica que no pueda reclutar al módulo de MAP cinasas y que no haya respuesta al estímulo de la feromona, por lo que produce células estériles.

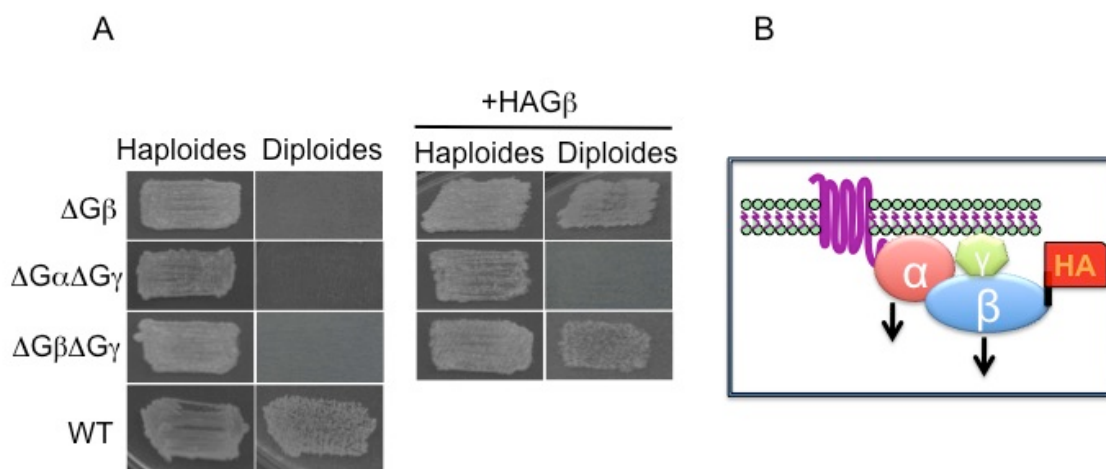


Figura 14. La construcción  $HAG\beta$  es funcional. (A) Se realizaron ensayos de apareamiento de las mutantes  $\Delta KIG\beta$ ,  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$ , y  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$ , recuperadas con la construcción  $HAG\beta$  (en *K. lactis*). Las células haploides de la cepa silvestre y las mutantes se crecieron en medio YPD por 24 hrs, el apareamiento se realizó por replicación en medio YPD toda la noche a 30°C y finalmente las células diploides se recuperaron en medio selectivo y se incubaron por 48 hrs a 30°C. (B) Esquema de la proteína G heterotrimérica acoplada a su receptor GPCR.

Adicionalmente se realizaron ensayos de apareamiento con las diferentes mutantes que se emplearon en el ensayo de inmunodetección transformadas con  $HAG\beta$  para observar si se podía revertir el fenotipo causado por la ausencia de  $G\beta$  y demostrar así que  $HAG\beta$  es funcional (figura 14). Se observó que las mutantes  $\Delta KIG\beta$  y  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$ , complementadas con  $HAG\beta$ , son fértiles, lo que muestra que la construcción  $HAG\beta$  es funcional. En los ensayos de apareamiento con la doble mutante  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$  complementada con  $HAG\beta$  no se pudo revertir la esterilidad (figura 14). Estos resultados nos indican que  $HAG\beta$  es funcional.

## 9.5. Estudio de la localización de $KIG\beta$ en ausencia de $KIG\gamma$ .

Los resultados anteriores sugieren que la subunidad  $KIG\beta$  se adhiere a la membrana plasmática por su interacción con la subunidad  $KIG\gamma$  o, en ausencia de ésta, por su interacción con  $KIG\alpha$ . Nos preguntamos entonces que pasaría si se afecta la interacción de  $KIG\beta$  con  $KIG\alpha$  en una mutante carente de  $KIG\gamma$ .



Para esto se sustituyó el residuo de triptófano de la posición 130 (Trp130) por una arginina (Arg) en la subunidad G $\beta$  (KlG $\beta$ <sup>R130</sup>). En trabajos previos (Whiteway, M., *et al.*, 1994) se describió una mutante equivalente en *S. cerevisiae* en donde se sustituyó el triptófano de la posición 136 (Trp136) por arginina (Arg). Esta mutación disminuyó considerablemente la interacción entre G $\beta$  y G $\alpha$ , sin afectar su capacidad de activar el apareamiento ni su asociación con G $\gamma$ .

El triptófano 130 está altamente conservado entre las subunidades G $\beta$  de levaduras, se encuentra en el segundo motivo WD y como se puede deducir del modelo del heterotrímero G $\alpha\beta\gamma$ , está en una de las asas presentes en la segunda hoja de la propela  $\beta$ , justamente en la interfase que hace contacto con la subunidad G $\alpha$  (figura 14). De acuerdo con el modelo de predicción estructural de *K. lactis*, el residuo de triptófano 130 de KlG $\beta$  también se encuentra en la fase de interacción con la subunidad KlG $\alpha$ , y se predice que hace interacción con el residuo de glutámico 280 (Glu280) de la subunidad KlG $\alpha$ . Este residuo está presente en la subunidad G $\alpha$  de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que la sustitución de Trp130 por Arg en KlG $\beta$  producirá el efecto descrito en *S. cerevisiae*.

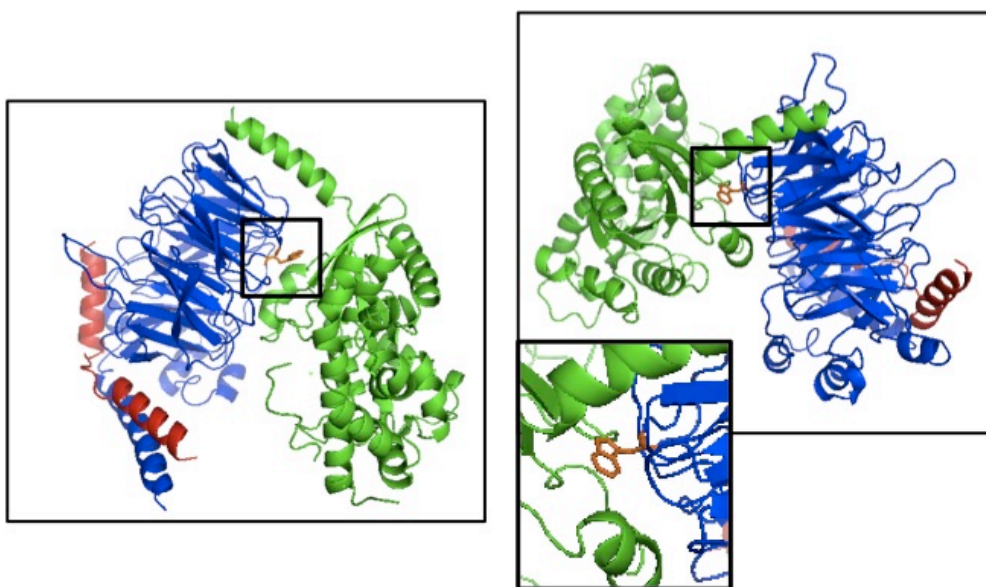


Figura 15. Imagen del heterotrímero de la proteína G de *K. lactis*. Se muestra en color naranja el Triptófano 130, que fue blanco de una mutación puntual por Arginina. En color azul se muestra la subunidad G $\beta$ , en color rojo la subunidad G $\gamma$  y en color verde se muestra la subunidad G $\alpha$ .

La sustitución en  $KIG\beta^{R130}$  fue introducida por PCR, los detalles de la técnica se mencionan previamente en la metodología. La mutación se verificó por secuenciación. La localización de esta proteína mutante se determinó por ensayos de inmunodetección con el anticuerpo anti-HA, de la misma manera que se realizaron los experimentos previos.

Se encontró que  $HAKIG\beta^{R130}$  se localiza como la subunidad  $KIG\alpha$  en la fracción de membrana en un fondo genético  $\Delta KIG\beta$ , debido a la presencia de  $KIG\gamma$ . Sin embargo cuando se expresó esta proteína en la doble mutante  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$  se observó que se localiza en mayor proporción con la fracción citoplásmica, aunque aún pudo detectarse una porción en la fracción membranal (figura 16).

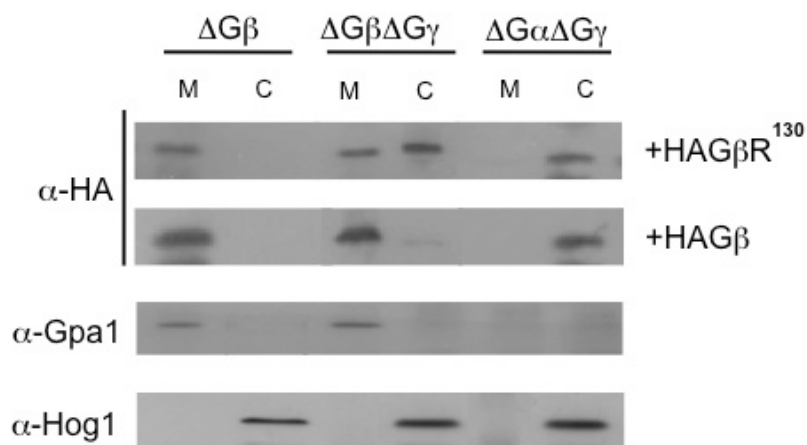


Figura 16. La subunidad mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  se localiza mayoritariamente en citoplasma, en comparación con la subunidad  $G\beta$  silvestre. Se realizaron ensayos de inmunodetección con la construcción  $KIHAG\beta^{R130}$ .  $\alpha$ -Gpa1 y  $\alpha$ -Hog1, son los anticuerpos que se utilizaron como controles de las fracciones de membrana y de citoplasma. Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y después se realizó hibridación tipo Western, con los anticuerpos antes indicados. M es la fracción membranal, y C la fracción citoplásmica. Se muestra un ensayo representativo de tres ensayos realizados.

Estos resultados sugieren fuertemente que el incremento en la concentración de  $KIHAG\beta^{R130}$  en el citoplasma se debe a una deficiencia en su interacción con la subunidad  $KIG\alpha$ , sin embargo,  $KIHAG\beta^{R130}$  aún se asocia parcialmente con la subunidad  $G\alpha$ , por lo que se observa una pequeña porción en la fracción membranal.

En estos resultados (Figura 16) se muestra que cuando  $KIHAG\beta^{R130}$  se expresa en presencia de las subunidades  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$  se observa solamente en la fracción de la membrana; indicando que  $KIG\beta$  no se distribuye en citoplasma gracias a su interacción con cualquiera de las subunidades que forman el heterotrímero.

Un ensayo de interacción por doble híbrido entre  $KIG\alpha$  y  $KIHAG\beta^{R130}$  muestra que la interacción es aproximadamente 3 veces menor que la interacción de  $G\alpha$  con  $KIG\beta$  silvestre. Puede observarse también que la sustitución de Trp130 por Arg en  $KIG\beta$  no altera su interacción con  $KIG\gamma$ , como se había demostrado para las mismas subunidades en *S. cerevisiae*.

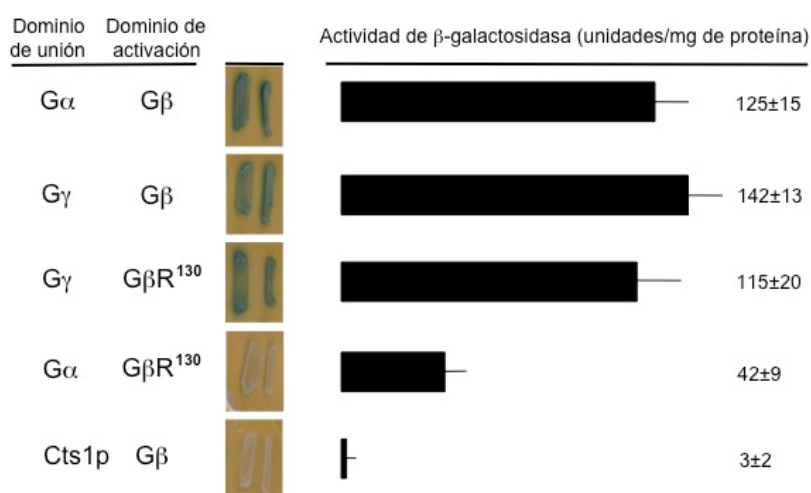


Figura 17. La subunidad mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  tiene menor interacción con  $G\alpha$ , que la subunidad  $G\beta$  silvestre. Se realizaron ensayos de doble híbrido con  $KIHAG\beta^{R130}$ , en donde se incluyeron la interacción entre  $KIG\alpha$  y  $KIG\beta$  silvestres, y  $KIG\beta$  y  $KIG\gamma$  también silvestres, así como el control negativo con endoquitinasa (Cts1p). Las construcciones de los plásmidos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Estos plásmidos se insertaron en la cepa EGY48 de *S. cerevisiae*. Se eligieron al menos dos clones de cada transformante y se crecieron en medio SGal adicionado con XGal, se dejaron incubando 24 hrs a 30°C. La cuantificación de la actividad de  $\beta$ -Galactosidasa corresponde al promedio de tres clones independientes.

Finalmente, se realizaron ensayos de apareamiento para comprobar el efecto de la mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  en *K. lactis*. Sin embargo, en la doble mutante  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$  el apareamiento decrece significativamente comparado con el de la misma mutante que expresa la  $G\beta$  silvestre (figura 18). Se sugiere que el reducido porcentaje de  $KIHAG\beta^{R130}$  que llega a la membrana plasmática puede activar la cascada de MAP cinasas y responder así al apareamiento, aunque de manera deficiente.

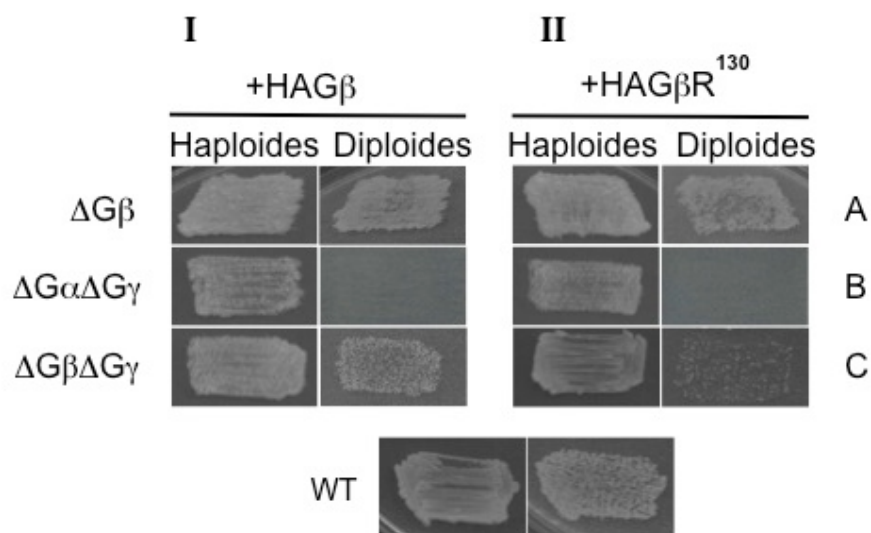


Figura 18. La subunidad mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  restaura el apareamiento. Se realizaron ensayos de apareamiento con las diferentes mutantes de la proteína G y transformadas con la construcción  $KIHAG\beta^{R130}$ . Se muestra un ensayo representativo de tres ensayos realizados.

En la figura 17 se hace una comparación del resultado del apareamiento de diferentes cepas mutantes complementadas con  $KIHAG\beta$  (I), y con  $KIHAG\beta^{R130}$  (II). En la línea A, se observa como la subunidad mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  restaura el apareamiento de la cepa mutante  $\Delta KIG\beta$ ; en la línea B, se observa que la cepa doble mutante  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$  es estéril en ambos casos; y finalmente en la línea C, se observa que la subunidad mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  recupera el apareamiento casi a un nivel silvestre en un fondo  $\Delta KIG\beta/\Delta KIG\gamma$  lo que indica que tiene una adecuada localización membranal, gracias a la subunidad  $KIG\alpha$ .

## 9.6. Fusión del motivo CCAAX a la subunidad $KIG\beta$

Los resultados obtenidos sugieren que la subunidad  $KIG\beta$  puede plegarse correctamente y es funcional en ausencia de la subunidad  $KIG\gamma$ , y que puede encontrar su lugar en la membrana plasmática. Esto último sugiere que la adición artificial del motivo CCAAX en uno de los extremos de  $KIG\beta$ , le permite anclarse en la membrana plasmática, plegarse correctamente, activar la respuesta a feromonas y revertir el efecto de la ausencia de las subunidades  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$ .

Para este ensayo fusionamos la región codificante de siete residuos del extremo C- terminal de la subunidad  $G\gamma$ , en donde se encuentra el motivo CCAAX (SACCTIM) al extremo carboxilo-terminal de la subunidad  $HAG\beta$ .

Se probó esta construcción  $HAG\beta$ -CCAAX en un fondo  $\Delta KIG\gamma/\Delta KIG\alpha$  y se observó su efecto en el apareamiento. Como se puede ver en la figura 19 la expresión de  $HAG\beta$ -CCAAX restaura parcialmente el apareamiento. Estos resultados muestran que la adición del motivo CCAAX le permite a la subunidad  $KIG\beta$  ( $HAG\beta$ -CCAAX) llegar a la membrana plasmática y activar la respuesta a la feromona sin requerir a las subunidades  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$ .

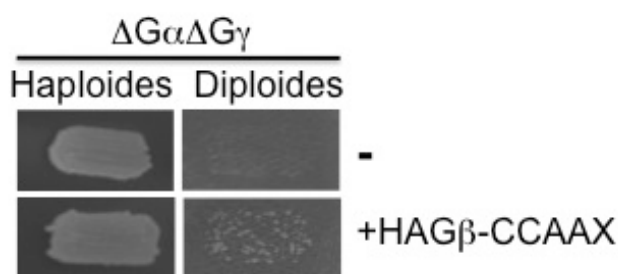


Figura 19. La fusión  $HAG\beta$ -CAAX restaura el apareamiento. Se realizaron ensayos de apareamiento con la construcción  $HAG\beta$ -CAAX, en un fondo genético carente de  $KIG\alpha$  y  $KIG\gamma$ . Los apareamientos se realizaron por replicación en medio YPD que se incubó toda la noche a  $30^{\circ}\text{C}$  y las células diploides se recuperaron en medio SD, que se incubó 48 hrs a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se muestra una imagen representativa de tres ensayos realizados.

Se realizaron también ensayos de inmunodetección en las mismas condiciones con el anticuerpo anti-HA (Figura 20). Se observó que en la doble mutante  $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$  una porción de  $HAG\beta$ -CCAAX se encuentra en la membrana plasmática, aunque la mayoría se distribuyó en el citoplasma. Este resultado explica que el apareamiento con  $HAG\beta$ -CCAAX no se recupere totalmente. Sin embargo, muestra la importancia de la localización de  $KIG\beta$  en la membrana plasmática, es decir, basta que una porción de  $KIG\beta$  pueda localizarse en membrana para que se active la respuesta a la feromona.

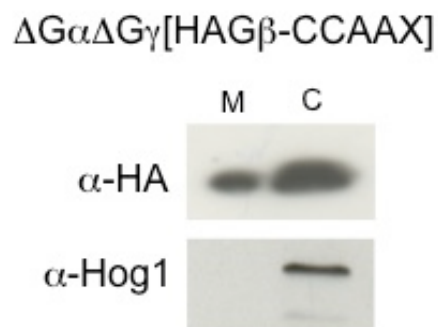


Figura 20. Parte de la subunidad HAG $\beta$ -CAAX se localiza en la fracción membranal. Se realizaron ensayos de inmunodetección de HAG $\beta$ -CAAX de las mismas mutantes ensayadas en la figura 19. Realizamos el ensayo con los anticuerpos  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -Hog1, como en los ensayos previos. Las muestras se corrieron en gel SDS-PAGE 10% y posteriormente se realizo la hibridación tipo western, con los anticuerpos indicados.

## 10. DISCUSIÓN

Las proteínas G heterotriméricas son componentes muy importantes en las células. El conocimiento de su composición y su ciclo de activación/inactivación es, sin duda, de gran importancia en el área de transducción de señales. En este trabajo se encontraron diferencias importantes en el mecanismo de activación de la proteína G heterotrimérica de *K. lactis* en comparación con la proteína G de *S. cerevisiae*, e incluso con las proteínas G descritas en otros sistemas como mamíferos.

En las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas estudiadas, se ha descrito que las tres subunidades son necesarias para la transducción de la señal, la ausencia de la cualquiera de estas proteínas producirá defectos en el mecanismo de activación de la proteína G, o bien en la activación de los efectores correspondientes (Vía canónica, figura 21). Los datos que se obtuvieron en este trabajo aportan evidencias para proponer una vía no canónica de activación de la proteína G heterotrimérica en donde con sólo dos componentes se puede llevar a cabo la señalización (figura 21).

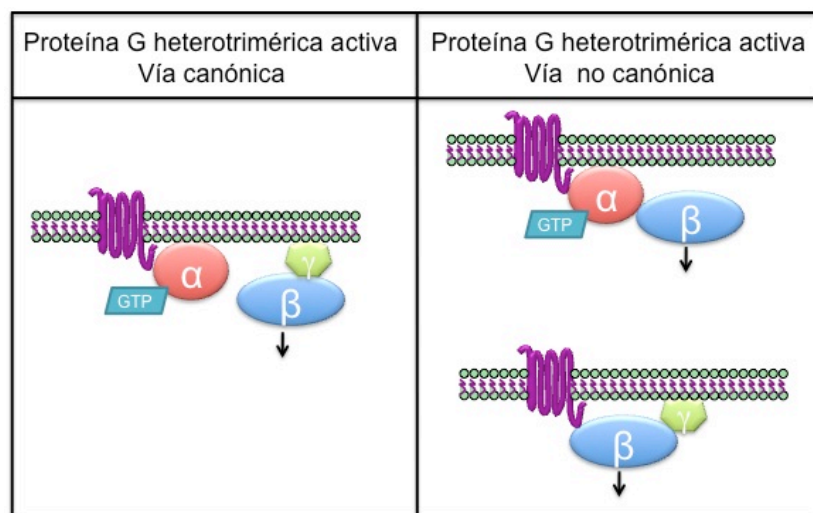


Figura 21. Esquemas de la activación de la proteína G heterotrimérica. Se compara la vía canónica de activación de estas proteínas, con una vía no canónica, propuesta en esta tesis.

La subunidad  $G\gamma$  se ha considerado como un componente esencial en las proteínas G heterotriméricas, sin embargo, en este trabajo encontramos que su participación puede ser dispensable para transducir y modular la respuesta a las feromonas. Como primera estrategia para elucidar por qué no es esencial, se estudió la

estructura primaria de la subunidad  $G\gamma$ ; se esperaba encontrar un bajo porcentaje de identidad entre la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* y la subunidad  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*, o la falta de algún motivo importante para la función de  $G\gamma$  en *K. lactis*, de manera que se pudiera explicar que la ausencia de la subunidad  $G\gamma$  no tiene efecto en la vía de respuesta a feromonas. Sin embargo, se encontró que la estructura primaria de  $G\gamma$  de *K. lactis* conserva todos los motivos esenciales para su función, lo que sugiere que esta subunidad tiene las características estructurales para desarrollar su función canónica. El porcentaje de identidad que se obtuvo es 52%, este valor puede deberse a que la secuencia de  $G\gamma$  de *K. lactis* es más corta por 20 residuos de aminoácidos que la secuencia de *S. cerevisiae*. Se ha observado que en general las subunidades  $G\gamma$  de diferentes levaduras tienen una identidad de alrededor del 50% (Shpakov, A.O., y Pertseva, M.N., 2008).

Las subunidades  $G\gamma$  de levaduras tienen dominios variables, excepto por el motivo CCAAX. Lo que sugiere que, como en otras proteínas, para la función de la subunidad  $G\gamma$  es más importante su estructura que su secuencia. En 2003, Chinault y Blumer, realizaron ensayos con subunidades  $G\gamma$  de diferentes especies de *Saccharomyces*. Observaron que cualquiera de las subunidades  $G\gamma$  podía recuperar el fenotipo de la mutante nula  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*, incluso las subunidades  $G\gamma$  que tenían menor similitud con la  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*. Todas las subunidades  $G\gamma$  probadas en ese ensayo conservan el motivo CCAAX en el extremo carboxilo terminal. Estos resultados muestran que la variabilidad en la secuencia de  $G\gamma$  no es de gran importancia para su función, excepto por el CCAAX.

En otra levadura perteneciente al grupo de los hemiascomycetes, *Schizosaccharomyces pombe*, se demostró que una fusión de  $G\beta$  con el CCAAX basta para tener un apareamiento eficiente en un fondo carente de  $G\gamma$  ( $\Delta G\gamma$ ). Este trabajo refuerza la hipótesis de que en algunas levaduras la subunidad  $G\gamma$  es importante solamente para la localización de  $G\beta$  en la membrana, pero no para la interacción con el receptor ni con los efectores (Landry, S., y Hoffman, C.S., 2001). En mamíferos, sin embargo, se ha observado que  $G\gamma$  tiene contactos con el receptor, de manera que cuando llega el estímulo,  $G\gamma$  favorece la apertura del sitio de unión al nucleótido para favorecer el intercambio de GDP por GTP (Kisselev, O., y Gautam, N., 1993).



---

Concluimos, con estas observaciones, que la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* tiene los elementos necesarios para realizar su función. Sin embargo, no es esencial para localizar a  $G\beta$  en la membrana plasmática, ni para activar a los efectores. ¿Cómo puede entonces la subunidad  $G\beta$  activar la vía de señalización? Se consideró que podía haber otra proteína similar a la subunidad  $G\gamma$  que llevara a la subunidad  $G\beta$  a la membrana plasmática. Para confirmar esta hipótesis se realizó una búsqueda exhaustiva (<http://genolevures.org/>) de genes que tuvieran el motivo CCAAX y que cumplieran con las características de la subunidad  $G\gamma$ , y no se encontraron genes con estas características.

Se demostró, en trabajos previos, que  $G\beta$  de *K. lactis* es 52% idéntica a la subunidad  $G\beta$  de *S. cerevisiae* y que conserva las características de este grupo de proteínas (Kawasaki, L., *et al.*, 2005). Para completar esos estudios, se realizó una búsqueda de motivos que pudieran ser blanco de modificaciones lipídicas post-traduccionales, lo que le conferiría a la subunidad  $G\beta$  la capacidad de anclarse en la membrana plasmática por sí sola. Pero no se encontró ninguna secuencia que pudiera tener este tipo de modificaciones. Se estudió la estructura terciaria de esta subunidad y se encontró que la estructura está altamente conservada, en comparación con la estructura típica de una subunidad  $G\beta$ .

Se realizaron, entonces, ensayos de doble híbrido para demostrar que sí es posible la interacción entre las subunidad  $G\gamma$  y  $G\beta$  de *K. lactis*. Los resultados fueron positivos. Se demostró que la subunidad  $KIG\beta$  es capaz de interactuar tanto con la subunidad  $KIG\gamma$  como con la subunidad  $KIG\alpha$ . Incluso se demostró la interacción heteróloga de la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* con la subunidad  $G\gamma$  de *S. cerevisiae*, y viceversa, la interacción de la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* con la subunidad  $G\beta$  de *S. cerevisiae*. Estos resultados muestran que las subunidades de *K. lactis* tienen las características estructurales necesarias para interactuar incluso con las subunidades de *S. cerevisiae*. A pesar de esto las subunidades de *K. lactis* no pueden complementar a las mutantes de *S. cerevisiae*. Estos datos sugieren fuertemente que las subunidades de *K. lactis* no tienen la misma función que las subunidades de *S. cerevisiae*, aunque la estructura es muy conservada.

Se ha demostrado que en *S. cerevisiae*  $G\gamma$  es importante para el contacto entre la subunidad  $G\beta$  y la proteína de andamiaje Ste5p, ya que una mutación que bloquea la interacción entre  $G\beta$  y  $G\gamma$  no permite la interacción de  $G\beta$  con el extremo amino-terminal de Ste5p, en *S. cerevisiae* (Whiteway, M., *et al.*, 1995). En nuestro trabajo se observó que en ausencia de  $KIG\gamma$ , la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* puede seguir activando a los efectores río abajo, ya que las células pueden aparearse, sugiriendo así que  $G\gamma$  de *K. lactis* no participa en la interacción con Ste5p ni con ningún otro de los efectores; y es por esta razón que la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* no puede rescatar el fenotipo de la mutante nula de  $G\gamma$  en *S. cerevisiae*.

Sin embargo, estas conclusiones no explican cómo en ausencia de  $KIG\gamma$ , la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* puede llegar a la membrana plasmática y activar la respuesta a la feromona de manera normal. Después de los resultados discutidos anteriormente, se consideró que la subunidad  $KIG\alpha$  es una proteína que podía localizar a la subunidad  $KIG\beta$  en la vecindad del receptor, ya que tiene modificaciones lipídicas que le permite anclarse en la membrana plasmática. Se demostró que cepas de *K. lactis* carentes de la subunidad  $G\alpha$  y de  $G\gamma$  ( $\Delta KIG\alpha/\Delta KIG\gamma$ ) son completamente estériles, lo que sugiere finalmente que la subunidad  $G\alpha$  conduce a  $G\beta$  a la membrana plasmática en ausencia de  $G\gamma$ .

Probablemente la interacción entre la subunidad  $G\beta$  y la subunidad  $G\alpha$  es diferente en *K. lactis*; esta posibilidad explicaría por qué la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* no puede rescatar el fenotipo de la mutante nula de  $G\beta$  en *S. cerevisiae*, es decir, si la interacción de  $G\beta$  de *K. lactis* con  $G\alpha$  de *S. cerevisiae* es más estable entonces  $G\beta$  no podría disociarse de  $G\alpha$  con la misma eficiencia y no podría activar a los efectores río abajo. Lo que sugiere entonces que hay diferencias en la interacción de  $G\alpha$  y  $G\beta$  de *K. lactis*.

Uno de los resultados obtenidos en este trabajo respalda esta hipótesis. Observamos que una mutante  $KIHAG\beta^{R130}$  en *K. lactis* sigue teniendo interacción con la subunidad  $G\alpha$ . En *S. cerevisiae* esta misma mutación bloquea por completo la interacción entre las subunidades  $G\beta$  y  $G\alpha$  (Whiteway, M., *et al.*, 1994). Sugerimos, entonces, que la interacción que hay entre las subunidades  $G\beta$ - $G\gamma$  de *K. lactis* es más fuerte que la interacción que hay entre las subunidades  $G\beta$ - $G\gamma$  de *S. cerevisiae*.

---

Probablemente debido a que hay más sitios de interacción entre las subunidades de *K. lactis*.

Aún quedan muchos aspectos por determinar respecto a las interacciones de la proteína G. Por ejemplo se ha reportado que las modificaciones lipídicas de  $G\gamma$  de *S. cerevisiae* permiten que el dímero ( $G\beta/G\gamma$ ) se mantenga unido al receptor aún después de la activación de la subunidad  $G\alpha$ . Se demostró que en mutantes en donde se elimina el CCAAX de  $G\gamma$ , la subunidad  $G\beta$  se localiza en la membrana en ausencia de la feromona, esto gracias a  $G\alpha$ . Pero una vez que se activa  $G\alpha$ , el dímero se distribuye en el citoplasma, deslocalizando a Ste5p, por lo que las células no pueden aparearse (Linder, M.E., *et al.*, 1991). Lo que lleva a preguntarnos cómo puede permanecer la subunidad  $KlG\beta$  en la membrana plasmática una vez que se activa  $KlG\alpha$  en ausencia de  $KlG\gamma$ , en la levadura *K. lactis*. Probablemente, si la interacción entre  $G\beta$  y  $G\alpha$  de *K. lactis* es más estable como proponemos, entonces los contactos intermoleculares permanecen aún después de la activación de  $KlG\alpha$ , y  $KlG\beta$  se mantiene en la membrana plasmática.

Entre los resultados obtenidos en este trabajo se demostró por ensayos de inmunodetección, que la subunidad mutante  $KlG\beta^{R130}$ , con una menor interacción con la subunidad  $G\alpha$ , se localiza en el citoplasma, pero no por completo, ya que se puede observar claramente que hay un porcentaje de esta subunidad que se localiza en la fracción de membrana. Posteriormente por ensayos de doble híbrido, se demostró que aún hay interacción entre esta mutante  $KlG\beta^{R130}$  y la subunidad  $G\alpha$ . Estos resultados sugieren que la interacción entre la subunidad  $G\beta$  y  $G\alpha$  de *K. lactis* permanece aún después de la activación por el estímulo de la feromona, manteniendo a la subunidad  $G\beta$  en la membrana plasmática, lo que explica que pueda haber señalización en ausencia de la subunidad  $G\gamma$ . Sin embargo, aún hacen falta ensayos que demuestren esta hipótesis.

Para demostrar que la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* es funcional en ausencia de  $G\gamma$ , se realizó la fusión HAG $\beta$ -CCAAX y en un fondo carente de  $G\alpha$  y de  $G\gamma$  ( $\Delta KlG\alpha/\Delta KlG\gamma$ ) se observó que las células pueden aparearse, aunque lo hacen deficientemente. En los ensayos de fraccionamiento celular e inmunodetección se mostró que esta fusión se localiza en la membrana plasmática, aunque mayoritariamente se encuentra en el citoplasma, lo que explica que el apareamiento sea deficiente. Este

resultado muestra que la subunidad KIG $\beta$  es funcional y suficiente para activar la respuesta a la feromona, es decir que no requiere de la subunidad KIG $\gamma$ . Sin embargo, deja en evidencia de que se requiere de otra proteína que la mantenga de manera estable en la membrana plasmática después de la activación por la feromona. Sugiere también que la subunidad KIG $\beta$  puede ser activada por el receptor sin necesidad de la intervención de la subunidad KIG $\alpha$ .

Por los resultados discutidos se muestran que hay diferencias entre el mecanismo de activación de la proteína G heterotrimérica de *S. cerevisiae* y la de *K. lactis*. La subunidad G $\gamma$  en *K. lactis* es dispensable, mientras que la subunidad G $\beta$  parece tener menos especificidad en interacción con las otras dos subunidades. Por el contrario, la proteína G de *S. cerevisiae* parece ser más compleja y más específica. Dado que *K. lactis* es una levadura evolutivamente más antigua que *S. cerevisiae*, se sugiere que la proteína G heterotrimérica evolucionó entre una levadura y otra, convirtiéndose en una proteína más específica en su interacción con las subunidades que la forman. En mamíferos, los homólogos a estas proteínas G son aún más complejos, la subunidad G $\gamma$ . Como se mencionó anteriormente, es necesaria para la interacción con los efectores y con el receptor, además de que mantiene la estabilidad del heterotrímero. Se sugiere entonces que la proteína G de *K. lactis* probablemente es un paso en la evolución de las proteínas G monoméricas a las proteínas G heterotriméricas, favoreciendo la especificidad de la respuesta a diferentes estímulos y permitiendo así la diversidad y variabilidad entre las subunidades que forman la proteína G.

En el área de la transducción de señales se ha considerado como un dogma que las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades indispensables, que a su vez forman dos unidades funcionales: G $\alpha$  y G $\beta$ /G $\gamma$ . En este trabajo se propone una alternativa a este mecanismo típico de la actividad del heterotrímero. No sólo se propone que la subunidad G $\gamma$  es dispensable, sino que la subunidad G $\beta$  posee la capacidad de interaccionar tanto con la subunidad G $\alpha$  como con la G $\gamma$  y ser funcional por sí sola, es decir que tanto G $\alpha$ /G $\beta$  como G $\beta$ /G $\gamma$  pueden responder al estímulo de la feromona. Aunque las tres subunidades participan en la vía de respuesta al apareamiento, sólo una de ellas es indispensable para activar esta vía. Estos resultados permiten modificar los conceptos que se tenían acerca del mecanismo de activación de las proteínas G heterotriméricas y de las vías de señalización que modulan.

## 11. CONCLUSIÓN

La ausencia de la subunidad  $G\gamma$  en *K. lactis* no generará esterilidad porque la subunidad  $KIG\beta$  sigue siendo activa y funcional.

La subunidad  $KIG\beta$  se localiza en la membrana plasmática por su asociación con  $KIG\alpha$  en la vecindad del receptor. Lo que permite la activación de la cascada de señalización en respuesta a la feromona.

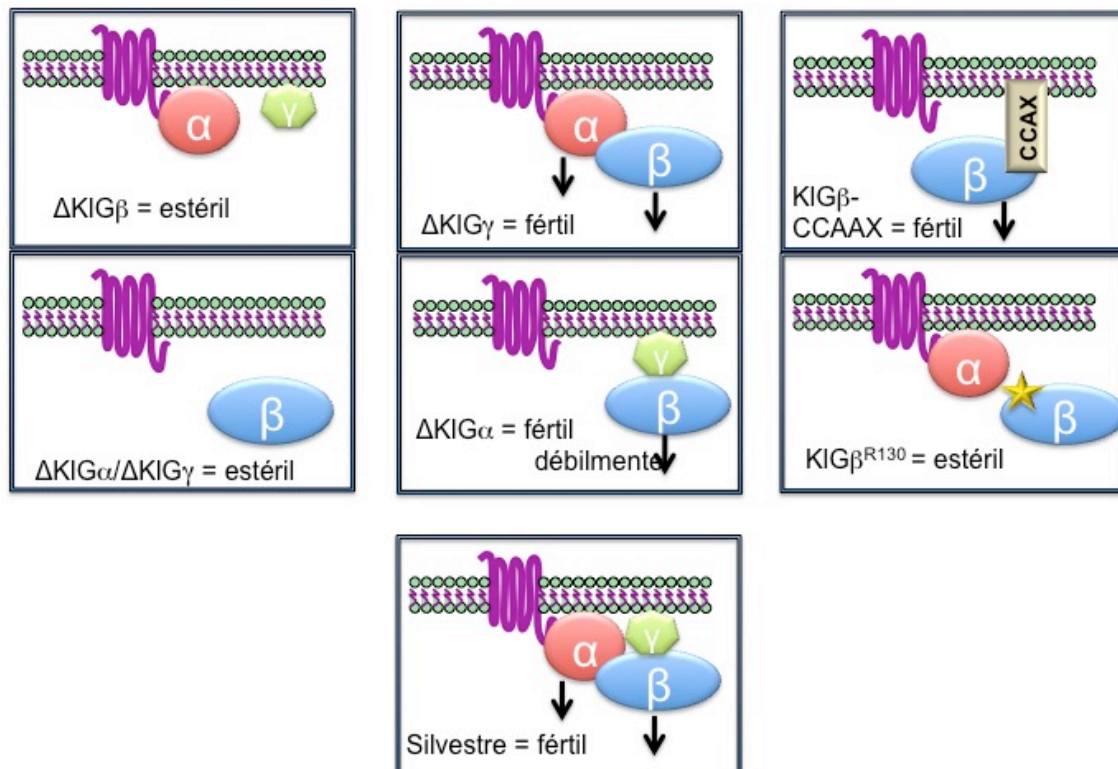


Figura 22. Esquemas de los diferentes fenotipos ocasionados por las mutantes en la proteína G, empleados en este trabajo.

## 12. PERSPECTIVAS

A lo largo del trabajo se muestra que el mecanismo de acción de la proteína G heterotrimérica de *K. lactis* es diferente al de *S. cerevisiae*. Sugerimos que la subunidad  $G\beta$  de *K. lactis* tiene una interacción más estable con la subunidad  $KIG\alpha$ , es por esto que sería muy interesante realizar ensayos de mutagénesis para determinar los residuos de aminoácidos que participan en esta interacción. Así mismo, se propone hacer un estudio más profundo acerca de los dominios estructurales de  $KIG\alpha$ , para determinar si hay diferencias entre esta subunidad de *K. lactis* y la subunidad de *S. cerevisiae*. Y para corroborar lo observado con el modelado molecular, se puede realizar la cristalización de las tres subunidades de la proteína G de *K. lactis*.

Entre los resultados presentados, se muestra que la subunidad  $G\gamma$  de *K. lactis* no es determinante en la interacción con los efectores; sin embargo, no se ha determinado aún cuáles son las regiones de la subunidad  $G\beta$  que permiten esta interacción, y si estas interacciones se ven afectadas por la ausencia de  $G\gamma$ . Se pueden realizar ensayos de interacción entre  $G\beta$  y los efectores (Ste5p, Ste20p, Cdc42p) y la comparación de los resultados en ausencia y presencia de  $G\gamma$ .

El trabajo se realizó haciendo comparaciones con las proteínas homólogas de *S. cerevisiae*; sin embargo, sería muy interesante analizar cómo se comportan  $G\beta$  y  $G\gamma$  en otras especies cercanas a *K. lactis*.

Se ha propuesto que la proteína moduladora Ste50p actúa como efector de la subunidad  $G\alpha$  (Sánchez-Paredes, E., *et al.*, en prensa). Probablemente esta proteína tenga interacción también con la subunidad  $G\beta$  y estabilice la interacción entre ambas subunidades. Algunos ensayos de interacción con estas proteínas y ensayos de mutagénesis ayudaría a determinar qué sucede con ambas proteínas.

El estudio evolutivo de los sistemas de transducción de señales mediados por proteínas G, es un estudio importante para determinar si lo que se observó en *K. lactis* es parte de un proceso que ha ido cambiando a lo largo de la evolución.

## 13. COMENTARIO EN SCIENCE SIGNALING POR Nancy R. Gough

*Sci. Signal.*, 9 February 2010  
Vol. 3, Issue 108, p. ec46  
[DOI: 10.1126/scisignal.3108ec46]

EDITORS' CHOICE

### Cell Biology Challenging the G $\beta\gamma$ Paradigm

Nancy R. Gough

*Science Signaling*, AAAS, Washington, DC 20005, USA

The dogma states that heterotrimeric G proteins have two active parts: the guanine nucleotide-binding G  $\alpha$  subunit and a dimeric subunit G $\beta\gamma$  composed of two proteins, the G $\beta$  and G  $\gamma$  subunits.

Additionally, most evidence suggests that the G $\alpha\beta\gamma$  complex with G  $\alpha$  bound to GDP is inactive and that GTP binding to G  $\alpha$  triggers the dissociation of the G  $\alpha$  subunit from G $\beta\gamma$ , allowing each subunit to then regulate the activity of downstream effectors. The study of the mating response of the budding yeast *Kluyveromyces lactis* by Navarro-Olmos *et al.* challenges two of these established paradigms in G protein signaling. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mating pheromone triggers the conventional pathway of GTP binding to G  $\alpha$  and separation of G $\beta\gamma$  from the activated complex, and G $\beta\gamma$  then activates the mitogen-activated protein kinase cascade to mediate the mating response. Despite structural similarities and sequence conservation and the ability to interact in a yeast two-hybrid system, the *K. lactis* G $\beta$  (KIG $\beta$ ) and G  $\gamma$  (KIG  $\gamma$ ) failed to suppress the sterile phenotype of *S. cerevisiae*, which suggests that the pathway may be different. Knocking out KIG $\beta$  alone abolished mating. Unexpectedly, knocking out KIG  $\gamma$  in *K. lactis* failed to compromise mating as long as the KIG  $\alpha$  subunit was present, but if both KIG  $\alpha$  and KIG  $\gamma$  were knocked out, then mating was compromised. Thus, mating appears to require G $\beta$  and either G  $\alpha$  or G  $\gamma$ , which suggests that either a G $\alpha\beta$  or a G $\beta\gamma$  complex may function in this pathway. The ability of KIG  $\gamma$  and KIG $\beta$  and for KIG  $\alpha$  and KIG $\beta$  to interact was confirmed by yeast two-hybrid assay. One role of the  $\gamma$  subunit in the function of G $\beta\gamma$  complexes is recruitment of the  $\beta$  subunit to membranes, and in *S. cerevisiae* mutation of the cysteine residue that is farnesylated in G  $\gamma$  (G  $\gamma$ S) behaves as a dominant-negative G  $\gamma$ . However, the equivalent mutation in *K. lactis* KIG  $\gamma$  failed to inhibit mating. KIG $\beta$  was associated with the membrane fraction in cells lacking KIG  $\gamma$  but was completely cytosolic in cells lacking both KIG  $\gamma$  and KIG  $\alpha$ . Adding a farnesylation motif to KIG $\beta$  partially targeted the protein to the membrane and partially rescued the mating defect in cells deficient in both KIG  $\gamma$  and KIG  $\alpha$ . Thus, it appears that in *K. lactis*, G $\beta$  can signal without G  $\gamma$  as long as it has a mechanism to reach the membrane.

R. Navarro-Olmos, L. Kawasaki, L. Domínguez-Ramírez, L. Ongay-Larios, R. Pérez-Molina, R. Coria, The  $\beta$  subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the  $\gamma$  subunit. *Mol. Biol. Cell* **21**, 489–498 (2010). [[Abstract](#)] [[Full Text](#)]

**Citation:** N. R. Gough, Challenging the G $\beta\gamma$  Paradigm. *Sci. Signal.* **3**, ec46 (2010).

The editors suggest the following Related Resources on Science sites:

**In Science Signaling**

**DATABASE OF CELL SIGNALING**

Pheromone Signaling Pathways in Yeast

Janna E. Slessareva and Henrik Dohlman

*Sci. Signal.* (Connections Map Pathway), [http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP\\_13999](http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP_13999)

| [Overview](#) » | [Specific Pathway](#) »

## 14. REFERENCIAS

Boguski, M.S., y McCormick, F., 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*; 366: 643-654.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., y McCormick, F., 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell function. *Nature*; 348: 125-132.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., y McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*; 349: 117-127.

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.

Clark, K. L., Dignard, D., Thomas, D.Y., y Whiteway, M. (1993). Interactions among the subunits of the G protein involved in *Saccharomyces cerevisiae* mating. *Mol Cell Biol* 13(1): 1-8.

Colombo, S., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, F., Colavizza, D., y Thevelein, J.M. 1998. Involvement of Distinct G-Proteins, Gpa2 and Ras, in glucose and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*; 17 (12): 3326-3341.

Coria, R., Ongay-Larios, L., y Birnbaumer, L., 1996. Separate Roles for N- and C-Termini of the STE4 ( $\beta$ ) Subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein in the mediation of the Growth Arrest. Lack of Growth-arresting activity of Mammalian  $\beta\gamma$  complexes. *Yeast*; 12: 41-51.

Coria, R., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L., Sanchez-Paredes, E., Velazquez-Zavala N., Navarro-Olmos, R., Rodriguez-Gonzalez, M., Aguilar-Corachan,



---

R., y Coello, G. (2006). The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 6: 336-344.

Dickinson, J.R. y Schweizer, M., 2004. *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Segunda edición. CRC Press. 49 pp.

Dietzel, C., y Kurjan, J., 1987. The Yeast SCG1 gene: a G alpha-like protein implicated in the a- and alpha-factor response pathway. *Cell*; 50(7): 1001-1010.

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

Downward, J., 1990. The Ras Superfamily of Small GTP-Binding Proteins. *Trends of Biochemical Science*; 15: 469-472.

Gaitatzes, C.G., Neer, E.J., y Smith, T.F., 1998. Pair of theoretical models for de *S. cerevisiae* G protein heterotrimer based on the coordinates of the mammalian G protein. PDB id: 1scg. <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1SCG>

Gaudet, R., Bohm, A., y Sigler, P. B., (1996). Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin BG and its regulator, phosducin. *Cell* 87: 577-588.

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.

Hamm H. 1998. The Many Faces of G Protein Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (2): 669-672.

---

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.

Kang, Y. S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J.M., y Tipper, D.J. (1990). Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian-yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 10(6): 2582-2590.

Kawasaki, L., Saviñon-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Ramirez, J., y Coria, R. (2005). The Gbeta (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.

Kisselev, O., y Gautam, N., 1993. Specific interaction with rhodopsin is dependent on the gamma subunit type in a G protein. *Journal of Biological Chemistry*; 268 (33): 24519-24522.

Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., de Winde, J.H., y Thevelein, J.M., 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology*; 32(5): 1002-1012.

Kocková-Kratochvílová A. 1990. Yeast and Yeast-like Organisms. VCH publishers, Nueva York. 528 pp.

Laalami, S., Grentzmann, G., Bremaud, L., y Cenatiempo, Y., 1996. Messenger RNA Translation in Prokaryotes: GTPase centers associated with Translational Factors. *Biochimie*; 78: 577-589.

Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., y Sigler, P.B., (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379: 311-319.

- 
- Landry, S., y Hoffman, C.S. (2001). The git5 Gbeta and git11 Ggamma form an atypical Gbg dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway. *Genetics* 157: 1159-1168.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., Thomas, D.Y., y Leberer, E., 1998. Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence Ste20/PAK family protein kinase. *Nature*; 391 (6663): 191-195.
- Lengeler, K., Davidson, R., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., y Heitman, J., 2000. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 64 (4): 746-785.
- Linder, M.E., Pang, I.H., Duronio, R.J., Gordon, J.I., Sternweis, P.C., y Gilman, A.G., 1991. Lipid Modification of G protein subunits. Myristoylation of G0 alpha increases its affinity for beta gamma. *Journal of Biological Chemistry*; 266 (7): 4654-4659.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B. 3rd, de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., y Richardson, D.C. (2003). Structure Validation by C-alpha geometry: phi, psi, and C-beta deviation. *Proteins*; 50: 437-450.
- Lukov, G. L., Hu, T., McLaughlin, J.N., Hamm, H.E., y Willardson B.M. (2005). Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein BG dimer assembly. *EMBO J* 24: 1965-1975.
- Lukov, G. L., Baker, C.M., Ludtke, P.J., Hu, T., Carter, M. D., Hackett, R.A., Thulin, C.D., y Willardson, B.M. (2006). Mechanism of Assembly of G Protein BG Subunits by Protein Kinase CK2-phosphorylated Phosducin-like Protein and the Cytosolic Chaperonin Complex. *J Biol Chem* 281: 22261-22274.
- Lupas, A., Van Dyke, M., y Stock. J., 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*; 252 (5010): 1162-1164.

---

Magee, T., y Marshall, C., 1999. New insights into interaction Ras with plasma membrane. *Cell*, 98: 9-12.

Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., y Sali, A., 2000. Comparative protein Structure modelling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*; 29: 291-325.

Miller J. H., 1992. *Experiments in Molecular Genetics*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. 520 pp.

Navarro-Olmos, R., 2006. 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 de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 50pp.

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

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.

Pandit, S.B., y Srinivasan, N., 2003., Survey for G-proteins in the Prokaryotic Genomes: Prediction of Functional Roles Based on Classifications. *Proteins*; 52 (4): 585-597.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenbatt, D.M., Meng, E.C., y Ferrin, T.E., 2004. UCSF-chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*; 25: 1605-1612.

Sánchez-Paredes, E., Kawasaki, L., Ongay-Larios, L., y Coria, R. The  $G\alpha$  subunit signals through the Ste50 protein during the mating pheromone response in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*; en prensa.

---

Saviñon-Tejeda A. L., Ongay-Larios L., Valdés-Rodríguez J., y Coria R. 2001. The *KlGpal* 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.

Shpakov, A.O., y Pertseva, M.N., 2008. Chapter Four: Signalling Systems of lower eukaryotes and their evolution. *International Review of Cell and Molecular Biology*; 29: 151-282.

Siderovski, D.P., y Willard, F.S., 2005. The GAPs, GEFs and GDIs of Heterotrimeric G Protein Alpha subunit. *International Journal of Biological Science*; 1: 51-66.

Smrcka, A.V., 2008. G protein  $\beta\gamma$  subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 65: 2191-2214.

Sondek J., Bohm 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.

Spiegel, A.M., Jones, T.L.Z., Simonds, W.F., y Weinstein, L.S., 1994. G Proteins. Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company, Austin, Texas, EUA. 144pp.

Staehele, P., Pitossi, F., y Pavlovic, J., 1993. Mx Proteins: GTPases with Antiviral Activity. *Trends in Cell Biology*; 3: 268-272.

Takida, S., y Wedegaertner, P.B. (2003). Heterotrimer Formation, Together with Isoprenylation, Is Required for Plasma Membrane Targeting of G $\beta\gamma$ . *J Biol Chem* 278: 17284-17290.

Torres-Quiroz, F., Kawasaki, L., Rodríguez-Gonzalez, M., Patron-Soberano, A., y Coria, R., 2007. The *K1STE2* and *K1STE3* genes encode MAT $\alpha$ - and MAT $\alpha$ -

---

specific G-protein-coupled receptors, respectively, which are required for mating of *Kluyveromyces lactis* haploide cells. *Yeast*; 24 (1): 17-25.

Van der Bliek, A.M., 1999. Functional Diversity in the Dynamin Family. *Trends in Cell Biology*; 9: 96-102.

Van der Voorn, L., y Ploegh, H.L., 1992. The WD-40 Repeat. *FEBS*; 307 (2): 131-134.

Versele, M., Lemaire, K., y Thevelein, J.M., 2001. Sex and Sugar in yeast: two distinct GPCR Systems. *EMBO Rep*; 2(7): 574-579.

Wang, Y., Chen, W., Simpson, D.M., y Ellion, E.A., 2005. Cdc24 regulates nuclear shuttling and recruitment of the Ste5 scaffold to a heterotrimeric G protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*; 280 (13): 13084-13096.

Wall, M.A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., y Sprang S.R., (1995). The structure of the G protein heterotrimer  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ . *Cell* 83: 1047-1058.

Walshaw, J., y Woolfson, D.N., 2001. SOCKET: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures *J. Mol. Biol.* **307**(5) 1427-50.  
<http://www.jic.ac.uk/staff/john-walshaw/socket.html>.

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.

Whiteway, M., Dignard, D., y Thomas D.Y. (1992). Mutagenesis of Ste18, a putative G gamma subunit in the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Biochem Cell Biol* 70((10-11)): 1230-1237.

Whiteway M., 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.

Whiteway, M.S., Wu, C., Leeuw, T., Clark, K., Fourest-Lieuvin, A., Thomas, D.Y., y Leberer, Y., 1995. Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP Kinase Scaffold Ste5p. *Science*; 269 (5230): 1572-1575.

## **15. Artículo:**

**The  $\beta$  subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the  $\gamma$  subunit.**

Navarro-Olmos, R., Kawasaki, L., Domínguez-Ramírez, L., Ongay-Larios, L., Pérez-Molina, R., and Coria, R.  
2009. Molecular Biology of the Cell.



# The $\beta$ Subunit of the Heterotrimeric G Protein Triggers the *Kluyveromyces lactis* Pheromone Response Pathway in the Absence of the $\gamma$ Subunit

Rocío Navarro-Olmos,\* Laura Kawasaki,\* Lenin Domínguez-Ramírez,<sup>†</sup>  
Laura Ongay-Larios,\* Rosario Pérez-Molina,\* and Roberto Coria\*

\*Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico and <sup>†</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, College of Biological Sciences, University of California at Davis, Davis, CA 95616

Submitted June 10, 2009; Revised November 24, 2009; Accepted December 2, 2009  
Monitoring Editor: Charles Boone

The *Kluyveromyces lactis* heterotrimeric G protein is a canonical  $G\alpha\beta\gamma$  complex; however, in contrast to *Saccharomyces cerevisiae*, where the  $G\gamma$  subunit is essential for mating, disruption of the  $KIG\gamma$  gene yielded cells with almost intact mating capacity. Expression of a nonfarnesylated  $G\gamma$ , which behaves as a dominant-negative in *S. cerevisiae*, did not affect mating in wild-type and  $\Delta G\gamma$  cells of *K. lactis*. In contrast to the moderate sterility shown by the single  $\Delta KIG\alpha$ , the double  $\Delta KIG\alpha \Delta KIG\gamma$  mutant displayed full sterility. A partial sterile phenotype of the  $\Delta KIG\gamma$  mutant was obtained in conditions where the  $KIG\beta$  subunit interacted defectively with the  $G\alpha$  subunit. The addition of a CCAAX motif to the C-end of  $KIG\beta$ , partially suppressed the lack of both  $KIG\alpha$  and  $KIG\gamma$  subunits. In cells lacking  $KIG\gamma$ , the  $KIG\beta$  subunit cofractionated with  $KIG\alpha$  in the plasma membrane, but in the  $\Delta KIG\alpha \Delta KIG\gamma$  strain was located in the cytosol. When the  $KIG\beta$ - $KIG\alpha$  interaction was affected in the  $\Delta KIG\gamma$  mutant, most  $KIG\beta$  fractionated to the cytosol. In contrast to the generic model of G-protein function, the  $G\beta$  subunit of *K. lactis* has the capacity to attach to the membrane and to activate mating effectors in absence of the  $G\gamma$  subunit.

## INTRODUCTION

Signal transduction mediated by heterotrimeric G proteins coupled to seven transmembrane receptors is an extremely widespread phenomenon in eukaryotic cells. In *Saccharomyces cerevisiae* the heterotrimer  $G\alpha(\text{Gpa1p})/G\beta(\text{Ste4p})/G\gamma(\text{Ste18p})$  is required for response to mating pheromones. This G protein is the same in *MATa* and *MAT $\alpha$*  cells. On pheromone interaction with a cell type-specific receptor, the G protein dissociates into  $G\alpha(\text{GTP})$  and the  $G\beta/G\gamma$  dimer, which in turn initiates a cascade of events that results in transcriptional activation of genes required for mating (Elion *et al.*, 1993, Olson *et al.*, 2000). Mating between haploid cells of the opposite mating types leads to the formation of a diploid *MATa/MAT $\alpha$*  cell. In *S. cerevisiae* disruption of the gene encoding the G-protein  $\alpha$  subunit leads to permanent growth arrest and therefore to lethality (Dietzel and Kurjan, 1987; Miyajima *et al.*, 1987), whereas inactivation of both, the  $G\beta$  and  $G\gamma$  subunits leads to sterility (Whiteway *et al.*, 1989). Moreover,  $G\beta$  subunit overexpression induces growth arrest and mating. On pheromone activation in *S. cerevisiae*, the liberated  $G\beta\gamma$  dimer directly associates with a scaffold protein Ste5p and with a p21-activated kinase (PAK), Ste20p, which is essential for activation of the MAPKKK Ste11p. Activation of Ste11p is also promoted by action of the adap-

tor protein Ste50p. Ste11p in turn, activates the MAPKK Ste7p. Downstream from Ste7p, Fus3p and Kss1p, two partially redundant MAPKs, induce the activation of transcription factors, Ste12p among others, which regulate the mating process (Breitkreutz *et al.*, 2001).

In the budding yeast *Kluyveromyces lactis*, the signal transduction system that mediates mating is triggered by both  $G\alpha$  (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001) and  $G\beta$  (Kawasaki *et al.*, 2005) subunits of the heterotrimeric G protein. In contrast to *S. cerevisiae*, inactivation of  $G\alpha$  in *K. lactis* does not affect cell viability, but produces partial sterility (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001); and overexpression of  $G\beta$  has no effect in mating, but its inactivation produces total sterility (Kawasaki *et al.*, 2005). These features of *K. lactis* G protein function, not observed in *S. cerevisiae*, may reflect a different control mechanism of the process for sexual reproduction. The actual knowledge of the pheromone response pathway in *K. lactis* shows that activation of G protein by binding of pheromone to G protein-coupled receptor triggers two branches: one is essential for mating and is triggered by the  $G\beta$  subunit, and the second is dispensable and is activated by  $G\alpha$ . These two branches converge in the MAP module formed by the scaffold K1Ste5p, the MAPKKK K1Ste11p, the MAPKK K1Ste7p, and the MAPK K1Fus3p (Kawasaki *et al.*, 2008).

In the heterotrimeric G protein-coupled receptor systems, the  $\beta\gamma$  dimer is a fundamental part of the transduction mechanism. Yeast  $G\beta$  and  $G\gamma$  form a stable dimeric complex similar in its structural and functional organization to the  $G\beta\gamma$ -dimer of vertebrates. The  $G\beta\gamma$  complex is associated with the membrane via isoprenyl modifications of the  $G\gamma$  subunit and promotes  $G\alpha$  association with membranes and receptors (Zhang and Casey, 1996). The  $G\beta\gamma$  dimer can also

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E09-06-0472>) on December 16, 2009.

Address correspondence to: Dr. Roberto Coria (rcoria@ifc.unam.mx).

activate effector proteins on its own or in parallel with  $G\alpha$  subunit (Clapham and Neer, 1993; Neer, 1995).

Crystal structures of the mammalian  $G\beta\gamma$  dimer have been solved (Sondek *et al.*, 1996). The  $G\beta$  subunit has a  $\beta$ -propeller structure, containing seven so-called WD repeats, each repeat being one blade of the propeller. The crystal structure has shown that the  $G\gamma$  subunit interacts with  $G\beta$  via an N-terminal coiled coil domain. Like  $G\beta$  of higher eukaryotes, the *S. cerevisiae*  $G\beta$  also has seven WD-repeats of 23–41 residues flanked as a rule by Gly/His at the N-terminus and Trp/Asp at the C-terminus. The N-terminus of yeast  $G\beta$  extends ~89 residues and is capable of forming a regular amphipathic helix enabling it to participate in the formation of a stable dimer with the N-terminus of  $G\gamma$ , which is itself a very long helix (Sondek *et al.*, 1996).

Although most  $G\beta\gamma$  dimers found in fungi species share the characteristics mentioned above, the  $G\beta$  subunit present in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that lacks the N-terminal extension still associates with the  $G\gamma$  subunit Git11 (Landry and Hoffman, 2001), indicating that the WD repeat of the  $G\beta$  subunit is sufficient to allow assembly of the  $G\beta\gamma$  dimer.

The  $G\beta\gamma$  dimer in *S. cerevisiae* is the main transducer of the pheromone signal that promotes mating. The  $G\beta\gamma$  dimer not only regulates positively the coupling between  $G\alpha$  and the pheromone receptor (Blumer and Thorner, 1990), but also is the main activator of the effector proteins, such as Ste20p, a member of the p21-activated protein kinase (PAK) family (Leberer *et al.*, 2000); Ste5p, which is the scaffold of the MAP kinase module (Whiteway *et al.*, 1995; Inouye *et al.*, 1997); and Cdc24p, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the small GTPase Cdc42 (Zheng *et al.*, 1994). As mentioned, lack of a  $G\gamma$  subunit renders a  $G\beta$  subunit incapable of triggering the pheromone pathway.

Even though *K. lactis* diverged from *S. cerevisiae* before the whole genome duplication (Scannell *et al.*, 2007), they are considered close relatives. Most orthologous genes in both species are highly conserved, for example, the G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits show 72% (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001) and 63% (Kawasaki *et al.*, 2005) similarity in their amino acid sequence, respectively. Contrary to the expectation that the  $G\beta\gamma$  function should be conserved between the two species, in this work we present evidence that the  $G\beta$  subunit is capable of positively activating the *K. lactis* pheromone response pathway in the absence of the  $G\gamma$  subunit.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and Media

Yeast strains used in this work were as follows: *Kluyveromyces lactis*: 155 (*MAT $\alpha$* , *ade2*, *his3*, *ura3*) and 12/8 (*MAT $\alpha$* , *lysA*, *argA*, *ura3*). *S. cerevisiae* strain EGY48 (*MAT $\alpha$* , *his3*, *trp1*, *ura3-52*, *leu2::pLeu-LexAop6*) was used for two-hybrid assays (Golemis *et al.*, 1997). *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  was used to propagate plasmids. YPD medium consisted of 1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose. YPGal was the same except that it contained galactose instead of glucose. SD minimal medium consisted of 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco, Detroit, MI) and 2% glucose. SGal was the same except for the substitution of glucose by galactose. For plasmid selection, SD minimal medium was supplemented with the required amino acids and nitrogen bases (50  $\mu$ g/ml). LB plus ampicillin (100  $\mu$ g/ml) was used to propagate recombinant plasmids in bacteria. SD medium containing 2 mg/ml uracil and 1 mg/ml 5-fluoroorotic acid (5-FOA) was used for negative selection of the *URA3* cassette.

### Gene Disruptions

*KISTE18* ( $G\gamma$ ) gene disruptions in both *MAT $\alpha$*  and *MAT $\alpha$*  cells were achieved by homologous recombination introducing the *URA3* marker. A 360-base pair PCR fragment (obtained with primers: -39 CCTGGGTAGTTTT -25 [primer 1] and +320 ATGTAACCTAATAAG +306 [primer 2]) containing the full open reading frame (ORF) was ligated into the pGEM-T-Easy vector

(Promega, Madison, WI) and then subcloned as a 365-base pair EcoRI fragment into the Yip352 integrative vector opened with the same enzyme. This integrative plasmid was linearized with BstEII and BglII (natural restriction sites in *KISTE18*) and used for yeast transformation. *URA3* strains were selected and gene disruption was confirmed by Southern blotting. Disruption of *KIGPA1* ( $G\alpha$ ) and *KISTE4* ( $G\beta$ ) genes was previously described (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2005). All single mutants were grown on FOA selection of *ura3* strains.  $\Delta$ *Kigpa1* $\Delta$ *Kiste18* and  $\Delta$ *Kiste4* $\Delta$ *Kiste18* double mutants were obtained by crossing single mutants and segregating double recombinants. The *Kiste4* mutant was transformed with a plasmidic *KISTE4* copy to alleviate its sterility before crossing it with *Kiste18*. The double mutants were confirmed by Southern blot hybridization.

### Gene Constructions and Mutagenesis

*KISTE18* was amplified by PCR from genomic DNA employing forward oligonucleotide + 1 ATGGGAGAGTTACCAT + 16 (primer 3), and backward primer 2 generating a 320-base pair product. This product containing the full *KISTE18* ORF was subcloned into pGEM-T-Easy. A 332-base pair NcoI-SalI fragment (filled in with Klenow) was obtained from the pGEM-T-Easy clone and was ligated into YEpKD (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001) opened at EcoRI (filled in with Klenow), yielding YEpKDSTE18, which places the *KISTE18* gene under the control of the *Gal1* promoter. To generate  $G\gamma^{S87}$ , YEpKDSTE18 was used as template in a PCR reaction employing primer 3 and oligonucleotide + 273 ATCACATTATGGTACTACTGGCACTCG + 247 (primer 4), which introduces A instead of T at position + 258 (underlined), rendering Ser instead of the Cys in position 87 of  $G\gamma$ . The PCR product which contains the full *KISTE18* ORF, was subcloned into pGEM-T-Easy and then into YEpKD following the same strategy as the wild-type gene. This generated YEpKDSTE18<sup>S87</sup>.

*KISTE4* was cloned into YEpKD as previously described (Kawasaki *et al.*, 2005). A hemagglutinin (HA) epitope was introduced in frame into the N-terminus of *KISTE4* as follows: The 3 $\times$  HA epitope was PCR amplified using forward primer 5'-CCCGGGATGTACCCATACGATGTTCTCTG-3' (primer 5) and reverse primer 5'-TGCTGAATCGACTTCCATAGCGTAATCTGGAACG-3' using a plasmid containing three copies of the sequence encoding the HA epitope as template. The forward primer was designed with an SmaI restriction site (underlined) and the reverse primer overlaps with six codons of the *KISTE4* 5' sequence (italics). This PCR product was then used as forward primer along with the *KISTE4* reverse primer 5'-TTTTTCGATATGCGGTACCATTTCTCAGT-3', which contains an Asp718 restriction site (underlined), using plasmid YEpKDSTE4 as template. The 1434-base pair PCR product was ligated into pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) to generate pTOPOSTE4. This plasmid was then digested with SmaI and Asp718, and the latter site was Klenow filled and the fragment thus obtained was cloned into YEpKDGalHis (Kawasaki *et al.*, 2005) previously digested with EcoRI and filled in with Klenow, rendering YEpKD-HA-STE4.

A 366-base pair fragment of *KISTE4* was amplified by PCR employing the forward primer 6: +35 ACAGGAAGCTGATTGTGC + 51 and the mutagenic primer 7: +401 GCTACTCAAGACCCGTTGGGATAACAA + 375, which introduces a C instead of T at position + 387 (underlined). This yields the substitution of Trp130 by Arg. The PCR product was used as a forward primer in a second PCR reaction using backward primer + 704 ATTATGACCATATCG + 690 (primer 8). The product was cloned into pGEM-T-Easy generating pGEMSTE4R<sup>130</sup>. A 369-base pair NdeI-NcoI restriction fragment was obtained from the pGEMSTE4R<sup>130</sup> plasmid and ligated into YEpKD-HA-STE4 digested with the same enzymes. This generated YEpKD-HASTE4R<sup>130</sup>.

Addition of a CCAAX motif into the COOH-end of the  $G\beta$  subunit was done as follows: A PCR reaction was performed employing primer 5 and backward primer 5'-CCCGGGTACATTATGGTACAACAGGCACTCTGATGAACCGGTGT-3', which contains an SmaI site (underlined), the last 24 nucleotides (italics) of the *KISTE18* gene including its stop codon, and the last 15 coding nucleotides of the *KISTE4* gene. A standard PCR reaction was performed using the plasmid YEpKD-HA-STE4 as template. The resulting PCR product encodes the HA- $G\beta$  protein with the last seven amino acid residues (SACCTIM) from  $G\gamma$  fused in its C-end. The PCR product was cloned into pGEM-T-Easy producing pGEMHA-STE4-CAAX. A SmaI fragment containing the fused gene was excised from this plasmid and subcloned into YEpKDGal previously digested with EcoRI and blunt ended with Klenow enzyme. This generated YEpKD-HA-STE4-CAAX.

### Mating Assays

A cell patch of the strain to be tested was grown on YPD or SD (for strains carrying plasmids) for 24 h. The tester strain was grown as a lawn on YPD for 24 h. Both strains were replica plated onto an YPD or YPGal (for YEpKDGal constructs) plate and incubated overnight at 30°C to allow cells to mate. Diploids were selected at 30°C by replica plating on SD medium and photographed 48 h later. For quantitative mating assays, strains to be tested were grown until midlog phase in SD medium (for strains carrying plasmids) and mixed in 100  $\mu$ l YPGal at a number of  $1 \times 10^6$  cells each strain. Mating was carried out incubating overnight at 30°C. Suspensions were diluted and plated on SD medium until diploid colonies appeared. Mating competition experiments were carried out following the same recipe, except that strains to be tested were mixed ( $0.5 \times 10^6$  cells each) before mating them with the tester strain.

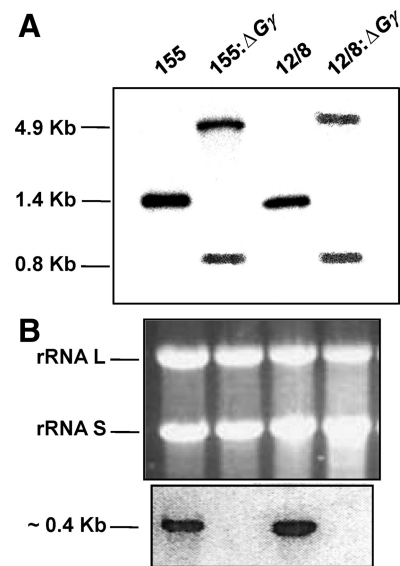


The *K. lactis* genome contains a single copy of the *KISTE18* (KLLA 0E06138g) gene that encodes a typical  $\gamma$  subunit of heterotrimeric G proteins. It has significant homology to ScG $\gamma$  (55% identity and 73% similarity, Figure 1B). KIG $\gamma$  is 90 amino acids long and contains the conserved C-terminal CCAAX motif (CCTIM) that is a potential target for farnesylation at Cys<sup>87</sup> and for palmitoylation at the preceding Cys<sup>86</sup> (Hirschman and Jenness, 1999). The presence of these highly conserved Cys residues in most fungal species suggests a conserved mechanism for the association of G $\gamma$  with the membrane. KIG $\gamma$  contains an N-terminal  $\alpha$  helical structure with heptad periodicity capable of forming a stable coiled-coil interaction with the long N-terminal region of the KIG $\beta$  subunit (Figure 1C). Most of the amino acid residues responsible for the formation of a stable G $\beta\gamma$  dimer complex are highly conserved in both KIG $\beta$  and the KIG $\gamma$  subunits. Twelve of 15 amino acid residues thought to form the coiled-coil domain are identical in the G $\gamma$ s of *K. lactis* and *S. cerevisiae*. Within this region, the amino acids that are predicted to make contact with the coiled-coil of G $\beta$ s are also identical (Figure 1C). The high similarity observed between the structures of KIG $\beta\gamma$  and ScG $\beta\gamma$  dimers could suggest that they may have similar function in the mating process; however, although KIG $\beta$  interacted with ScG $\gamma$  and ScG $\beta$  interacted with KIG $\gamma$  in a two hybrid experiment (see Figure 4), neither KIG $\beta$  (Kawasaki *et al.*, 2005) nor KIG $\gamma$  suppressed the sterile phenotype displayed by *S. cerevisiae*  $\Delta$ G $\beta$  and  $\Delta$ G $\gamma$  mutants respectively (not shown).

#### The G $\gamma$ Subunit of the Heterotrimeric G Protein Is Dispensable for Mating in *K. lactis*

To test the role of the G-protein  $\gamma$  subunit in the pheromone response pathway in *K. lactis*, we isolated the *KIG $\gamma$*  gene by PCR mediated amplification, and we introduced a *URA3* cassette in the ORF generating at the same time a 61-base pair deletion. The G $\gamma$  gene was disrupted in both *MAT $\alpha$*  and *MAT $\alpha$*  cells by homologous recombination according to the strategy described in *Materials and Methods*. Southern blot analysis confirmed that *URA3* transformants of both mating types carried the disrupted *KIG $\gamma$*  allele. An expected HindIII 1.4-kb fragment that cross-reacted with the radiolabeled probe is observed in the wild-type strains, whereas two fragments are detected in the mutant loci due to an extra HindIII site present in the YIp352 integrating plasmid (Figure 2A). Additionally, total RNA subjected to Northern blot analysis showed that  $\Delta$ *KIG $\gamma$*  mutants of both mating types lack the ~0.4-kb fragment corresponding to the G $\gamma$  mRNA observed in wild-type cells (Figure 2B).

Mating in *K. lactis* is triggered by both KIG $\alpha$  and KIG $\beta$  subunits of the heterotrimeric G protein (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2005). When the gene encoding the KIG $\beta$  subunit was inactivated the cells became sterile (Figure 3, Table 1; Kawasaki *et al.*, 2005), whereas inactivation of the gene encoding the KIG $\alpha$  subunit diminished mating to ~10% (Figure 3, Table 1; Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001). Surprisingly, disruption of *KIG $\gamma$*  had no effect in the mating process, yielding cells with almost intact capacity to mate (90% of the control) when assayed in crosses with wild-type cells (Figure 3, Table 1). The same mating efficiency was observed in  $\Delta$ *KIG $\gamma$*  mutants of both *MAT $\alpha$*  and *MAT $\alpha$*  cells, indicating that this phenotype is independent of the mating type. A slight mating defect (~55% of the control) can be observed when both mating partners carry the disrupted *KIG $\gamma$*  allele (Table 1). These findings indicate that the KIG $\gamma$  subunit is dispensable for mating in *K. lactis* and are in contrast with the sterile phenotype displayed by *S. cerevisiae* strains where the G $\gamma$  gene has been deleted (Whiteway *et al.*,

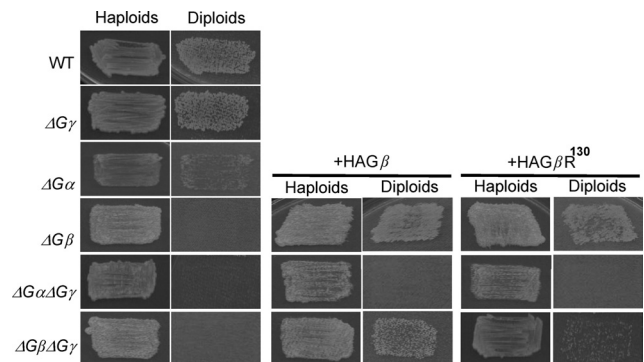


**Figure 2.** (A) Disruption of the *KIG $\gamma$*  gene. Cells were grown overnight in YPD medium, and genomic DNA from *MAT $\alpha$*  (155) and *MAT $\alpha$*  (12/8) wild-type strains and their  $\Delta$ *KIG $\gamma$*  mutants was obtained by a standard phenol-extraction protocol. DNA was digested with HindIII, subjected to Southern blot analysis and probed with the full radiolabeled G $\gamma$  gene. (B) Expression of the *KIG $\gamma$*  gene. Cells were grown to midlog phase in YPD medium, harvested, and resuspended in water. Total RNA from wild-type and disrupted strains was extracted by the standard acidic-phenol protocol and was subjected to Northern blot analysis using a *KIG $\gamma$*  gene probe. Large and small rRNA are indicated.

1989). The above observations also indicate that pheromone signaling can be satisfied in *K. lactis* by action of KIG $\alpha$  and KIG $\beta$  alone and suggest that KIG $\beta$  is able to activate mating effectors in the absence of the KIG $\gamma$  subunit.

#### The $\Delta$ *KIG $\gamma$* Mutant Mates Less Efficiently When Competed with Wild-Type Cells

Although the KIG $\gamma$  subunit is dispensable for the mating pathway, the slight reduction in mating of the  $\Delta$ *KIG $\gamma$*  strain



**Figure 3.** Effect of inactivation of G protein subunits on mating. Mating was done by replica-plating strain 155 (WT) or its mutants onto YPD plates containing a lawn of *MAT $\alpha$*  cells (strain 12/8), followed by incubation overnight at 30°C. Diploid selection was done by replica-plating onto SD. Pictures were taken after 48-h incubation at 30°C. For strains carrying plasmids YEpKD-HA-STE4 (+HAG $\beta$ ) and YEpKD-HA-STE4R<sup>130</sup> (+HAG $\beta$ R<sup>130</sup>), mating was carried on YPGal plates.

**Table 1.** Mating efficiency of *K. lactis* mutant strains

Strains			Mating efficiency
WT(155)	×	WT (12/8)	1.00
$\Delta$ G $\alpha$	×	WT	0.10
$\Delta$ G $\beta$	×	WT	<0.001
$\Delta$ G $\gamma$	×	WT	0.90
$\Delta$ G $\gamma$	×	$\Delta$ G $\gamma$	0.55
WT[G $\gamma$ ]	×	WT	0.95
$\Delta$ G $\gamma$ [G $\gamma$ ]	×	WT	0.92
WT[G $\gamma$ S <sup>87</sup> ]	×	WT	0.94
$\Delta$ G $\gamma$ [G $\gamma$ S <sup>87</sup> ]	×	WT	0.92
$\Delta$ G $\alpha$ $\Delta$ G $\gamma$	×	WT	<0.001

Numbers are relative to the mating efficiency of the wild-type cross (155  $\times$  12/8) and are representative of three independent experiments. All mutants are derived from strain 155 and were mated using wild-type 12/8 or mutant 12/8  $\Delta$ G $\gamma$  as tester strains. All 155 isogenic strains carried the YE $\rho$ KD vector, alone or with the indicated G $\gamma$  allele. Crosses were done by mixing  $1 \times 10^6$  cells of each parent and incubating in YPGal overnight at 30°C. Cells were collected, diluted, and plated on SD medium until colonies appeared.

could explain why this gene is conserved in *K. lactis*. To address this question, we conducted a mating experiment where  $\Delta$ KIG $\gamma$  cells were competed in mating with wild-type cells. For this we combined  $0.5 \times 10^6$  mutant cells with the same number of wild-type cells, of the same mating type, and mated them to a tester strain. Diploids arose from the wild-type-wild-type cross were identified by the *ura3* auxotrophy compared with the *URA3* genotype of the  $\Delta$ KIG $\gamma$ -wild-type diploids. In these conditions it was observed that 70% of the diploids obtained were formed by wild-type cells, whereas only 30% were obtained from the  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant, indicating that cells lacking the KIG $\gamma$  subunit are less efficient in diploid formation when competed with wild-type cells.

#### Replacement of Cys by Ser at Position 87 in KIG $\gamma$ Has No Effect on Mating in *K. lactis*

In *S. cerevisiae*, substitution of the Cys residue in the C-terminal CAAX motif of the G $\gamma$  subunit affects its farnesylation, and upon G protein activation leads to dissociation of the G $\beta\gamma$  dimer from the plasma membrane (Manahan *et al.*, 2000). Cells carrying this G $\gamma$  mutant form are insensitive to pheromone and hence are unable to mate (Whiteway and Thomas, 1994). Furthermore, substitution of the Cys residue located in the CAAX motif by Ser produces a dominant-negative phenotype, i.e., the G $\gamma$ S mutant subunit is capable of sequestering the G $\beta$  subunit to form an unproductive dimer, inducing sterility in *S. cerevisiae*, even in the presence of the wild-type G $\gamma$  (Grishin *et al.*, 1994). To investigate if the equivalent unfarnesylated version of *K. lactis* G $\gamma$  subunit behaves as dominant-negative, we substituted the Cys residue at position 87 (Figure 1) by Ser and expressed this mutant form in wild-type and  $\Delta$ KIG $\gamma$  strains. In crosses with a wild-type tester strain, no effect on mating was observed when either KIG $\gamma$  or KIG $\gamma$ S<sup>87</sup> were expressed in wild-type or in  $\Delta$ KIG $\gamma$  haploid cells (Table 1). These observations indicate that the unfarnesylated KIG $\gamma$  is inert for the mating system in *K. lactis*.

#### Inactivation of KIG $\gamma$ in the $\Delta$ KIG $\alpha$ Mutant Produces Sterility

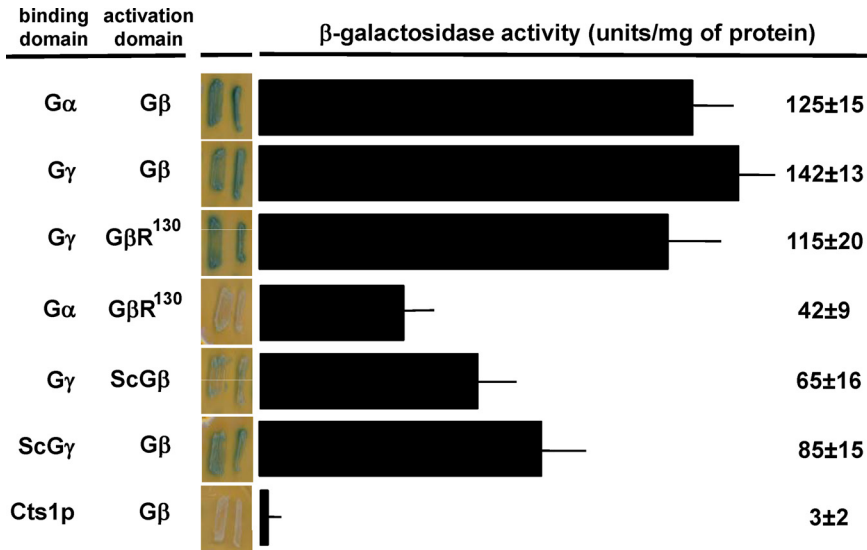
The above results suggest that the KIG $\beta$  subunit is capable of accessing its active location to trigger the mating pathway, even in the absence of the KIG $\gamma$  subunit. This could be accomplished by its interaction with the KIG $\alpha$  subunit. The KIG $\alpha$ -mediated targeting of KIG $\beta$  would not be competed by KIG $\gamma$ S<sup>87</sup>. If this assumption is correct, then KIG $\beta$  will be unable to activate the mating pathway in a cell devoid of both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$  subunits, and thus inactivation of the KIG $\gamma$  subunits should eliminate the remaining mating capacity of the  $\Delta$ KIG $\alpha$  mutant. An experiment of diploid formation showed that the double  $\Delta$ KIG $\alpha$  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant was totally sterile (Figure 3, Table 1). This result shows that in the double  $\Delta$ KIG $\alpha$   $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant the KIG $\beta$  subunit is not functional and indicates that in order to activate the mating pathway, KIG $\beta$  requires KIG $\alpha$  and/or KIG $\gamma$  subunits.

#### The KIG $\beta$ and KIG $\gamma$ Subunits Interact in a Two-Hybrid Assay

Although KIG $\beta$  and KIG $\gamma$  have the structural requirements to form a stable complex (Figure 1), it is possible that in vivo these subunits do not interact with each other. To address this question, we determined physical interactions between wild-type KIG $\beta$  and KIG $\gamma$  subunits by means of the two hybrid interaction system. The assay consisted on a DNA binding domain composed of a LexA-G $\gamma$  fusion protein under the control of the *Adh1* promoter, and a transcription activation domain containing the acid Blob B42-G $\beta$  fusion protein under the control of the *Gal1* inducible promoter (Golemis *et al.*, 1997). Determination of blue-colony intensity and quantification of  $\beta$ -galactosidase activity showed that KIG $\gamma$  is able to associate strongly with the KIG $\beta$  subunit (Figure 4). The KIG $\beta$ -KIG $\gamma$  interaction was as strong as the interaction observed between LexA-G $\alpha$  with B42-G $\beta$  fusions (Figure 4). As mentioned above, we also observed heterologous interaction between G $\beta$  and G $\gamma$  subunits from *K. lactis* and *S. cerevisiae*, indicating that some of the basic elements leading to formation of G $\beta$ /G $\gamma$  complexes are conserved in these two species.

#### The KIG $\beta$ Subunit is Located in the Membrane Fraction in the $\Delta$ KIG $\gamma$ Strain

Membrane anchoring of the G $\alpha\beta\gamma$  complex is needed for efficient signaling in *S. cerevisiae*. For this, it has been shown that not only the G $\gamma$  subunit is farnesylated and S-palmitoylated but also the G $\alpha$  subunit is N-myristoylated and S-palmitoylated (Dohlman and Thorner, 2001). Because no modification has been observed in the G $\beta$  subunit of *S. cerevisiae*, its attachment to the membrane depends entirely on G $\gamma$ . To determine the cellular localization of the KIG $\beta$  subunit in the  $\Delta$ KIG $\gamma$  and the  $\Delta$ KIG $\alpha$  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutants in *K. lactis* we separated the cytosolic (C) and membrane (M) fractions from these strains and performed immunodetection on nylon membranes as described in *Materials and Methods*. To detect the KIG $\beta$  subunit we fused the HA epitope at its N-terminus (HAG $\beta$ ) and probed it with an anti-HA antibody. To detect KIG $\alpha$  we probed the nylon membranes with an antibody against the *S. cerevisiae* Gpa1 protein, and finally, we used an anti-Hog1 antibody to detect Hog1p, a protein implicated in response to hyperosmotic stress that is located in the cytosol in iso-osmotic conditions (Westfall *et al.*, 2008). As shown in Figure 5, the HAG $\beta$  subunit is detected in the membrane fraction when expressed in a strain lacking the endogenous KIG $\beta$  subunit. The HAG $\beta$  protein is predominantly associated to the membrane fraction in the



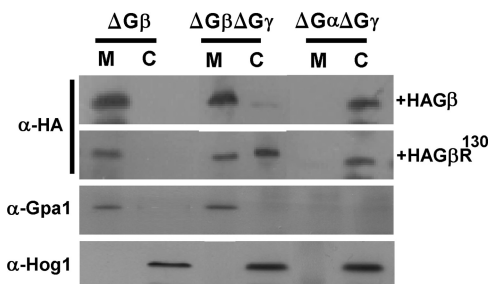
**Figure 4.** Physical association of G protein subunits determined by the two-hybrid system. The binding domain corresponds to LexA-fused proteins cloned into pEG202 and activation domain corresponds to B42-fused proteins cloned into pJG4-5. G $\beta$  and G $\gamma$  from *S. cerevisiae* are named as Sc. Two-hybrid plasmids were introduced into strain EGY48, and two independent clones were plated on SGal plates containing 1 mg/ml X-Gal. Pictures were taken 24 h after incubation at 30°C. Quantitation of  $\beta$ -galactosidase activity was determined as described (Ongay-Larios *et al.*, 2000). The  $\beta$ -galactosidase activity corresponds to the average value of three independent clones. The *S. cerevisiae* endochitinase (Cts1p) was used as negative interaction control.

$\Delta KIG\beta\Delta KIG\gamma$  mutant, although a small but detectable amount is also present in the cytosolic fraction. In these two strains, the HAG $\beta$  cofractionates with the KIG $\alpha$  subunit, consistent with membrane localization of both proteins. However, when the HAG $\beta$  protein was expressed in the double  $\Delta KIG\alpha\Delta KIG\gamma$  mutant, it was detected only in the cytosolic fraction, colocalizing with Hog1p. These results strongly suggest that in the absence of KIG $\gamma$ , the KIG $\beta$  subunit remained tethered to the plasma membrane by its association with the KIG $\alpha$  subunit. In the absence of both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$ , the KIG $\beta$  subunit is released from the membrane and becomes nonfunctional. Although a small fraction of the HAG $\beta$  protein is located in the cytosol in the  $\Delta KIG\beta\Delta KIG\gamma$  strain this is not the result of overexpression since HAG $\beta$  was never detected in the cytosolic fraction in the  $\Delta KIG\beta$  mutant; instead, we think that the KIG $\alpha$ -KIG $\beta$  association is not strong enough to titer the full amount of KIG $\beta$  and/or the cellular content of KIG $\beta$  in this strain exceeds that of KIG $\alpha$ . These results are also in full agreement with the observations made in the mating experiments, where KIG $\beta$  triggers mating only in the presence of either KIG $\alpha$  or KIG $\gamma$  or both proteins. Finally, the chimeric HAG $\beta$  protein retained its function since it is able to reverse the sterile phenotype displayed by the  $\Delta KIG\beta$  and  $\Delta KIG\beta\Delta KIG\gamma$

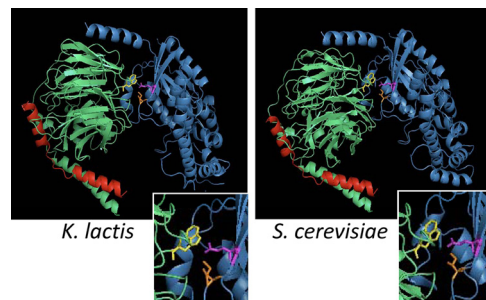
mutants, but as expected, fails to reverse the sterility of the  $\Delta KIG\alpha\Delta KIG\gamma$  mutant (Figure 3).

**Targeting of KIG $\beta$  Depends on KIG $\alpha$  in the Absence of KIG $\gamma$**

To test the hypothesis that attachment of KIG $\beta$  to the plasma membrane is due to its interaction with KIG $\alpha$  when the KIG $\gamma$  subunit is missing, we determined the cellular localization of a KIG $\beta$  subunit in which the Trp130 has been substituted by Arg (KIG $\beta$ R<sup>130</sup>) and investigated the role of this mutant subunit in the mating pathway. It has been described that in *S. cerevisiae* the equivalent mutation in G $\beta$  (Trp136  $\times$  Arg) diminishes its association with G $\alpha$  without affecting its capacity to activate effectors and to trigger mating (Whiteway *et al.*, 1994). This Trp residue is highly conserved among fungi G $\beta$ s, lying within the second WD motif and as deduced by the structural model of G $\alpha\beta\gamma$  trimer, is located in a loop of the second blade of the  $\beta$  propeller, forming the interface that makes contact with G $\alpha$  (Figure 6). According to the structural model, the Trp130 residue of the KIG $\beta$  subunit faces Ile278 and Glu280 of the G $\alpha$  subunit (*K. lactis* coordinates) and maintains a productive interaction with Glu280. These residues are also conserved in the *S. cerevisiae* G $\alpha$  (Figure 6); therefore it is reasonable to assume that



**Figure 5.** Immunodetection of the KIG $\beta$  subunit. Cells expressing the wild type (HAG $\beta$ ) and mutant (HAG $\beta$ R<sup>130</sup>) HA epitope-tagged versions of KIG $\beta$  under the control of the *GAL1* promoter (YEpkD plasmid) were fractionated as indicated in *Materials and Methods*. Fifteen micrograms of protein from the membrane (M) or cytosolic (C) fractions was resolved in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with either anti-HA, anti-Gpa1 (G $\alpha$  subunit), or anti-Hog1.



**Figure 6.** Ribbon representation of the G $\alpha\beta\gamma$  complexes from *K. lactis* and *S. cerevisiae*. G $\alpha$  is shown in blue, G $\beta$  in green, and G $\gamma$  in red. Regions not modeled due to disorder are not shown. The *K. lactis* Trp130 (136 in *S. cerevisiae*) in G $\beta$  is shown in yellow, relative to Ile278 (magenta) and Glu280 (orange) of the G $\alpha$  subunit (positions 303 and 305, respectively, in *S. cerevisiae*).

substitution of Trp130 by Arg in KIG $\beta$  will produce the effect described in *S. cerevisiae*. By PCR, we introduced Arg at position 130 in the HAG $\beta$  subunit and determined its localization by immunodetection with the anti-HA antibody. It was found that the HAG $\beta$ <sup>R130</sup> subunit cofractionated with KIG $\alpha$  in the membrane fraction when expressed in the  $\Delta$ KIG $\beta$  mutant (Figure 5); however, when expressed in the double  $\Delta$ KIG $\beta$  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant it was mostly located in the cytosol, although a significant amount was still detected in the membrane fraction. We concluded that the increased solubilization of HAG $\beta$ <sup>R130</sup> was the result of a defective interaction with the KIG $\alpha$  subunit; however, they still associate at a limited level. In a control two hybrid experiment for physical interaction, we observed that indeed, KIG $\beta$ <sup>R130</sup> interacted with KIG $\alpha$  3-fold less efficiently compared with the interaction of KIG $\alpha$  with the wild-type KIG $\beta$  subunit (Figure 4). In agreement with the result found in *S. cerevisiae* (White-way *et al.*, 1994), substitution of Trp130 by Arg in *K. lactis* G $\beta$ , did not affect its interaction with the KIG $\gamma$  subunit (Figure 4). Presence of both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$  totally prevented the partition of HAG $\beta$ <sup>R130</sup> to the cytosolic fraction (Figure 5). However, the HAG $\beta$ <sup>R130</sup> was detected entirely in the cytosolic fraction when it was expressed in a strain devoid of both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$  subunits, (Figure 5).

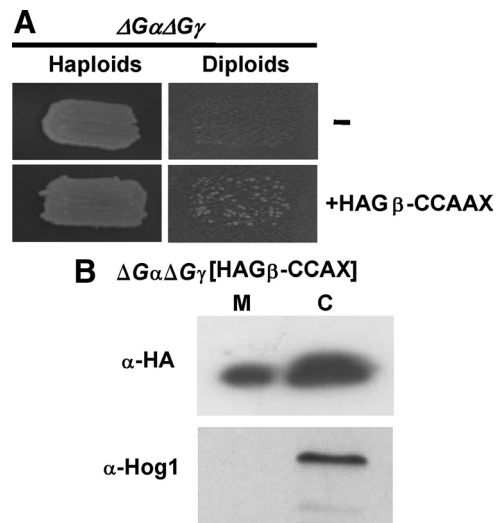
Finally, we determined the effect that the substitution of Trp130 by Arg in KIG $\beta$  has in the mating pathway of *K. lactis*. In agreement with the localization and interaction experiments, expression of HAG $\beta$ <sup>R130</sup> in the  $\Delta$ KIG $\beta$  mutant restored mating to almost wild-type level, whereas mating of a strain devoid of KIG $\gamma$  was significantly reduced (Figure 3). It was possible to observe an increased mating efficiency in the  $\Delta$ KIG $\beta$  $\Delta$ KIG $\gamma$  strain expressing HAG $\beta$ <sup>R130</sup> with long incubation periods of the mixture crosses, although it never reached the mating efficiency of cells expressing the wild-type KIG $\beta$ . These observations suggest that the formation of a small amount of KIG $\alpha$ KIG $\beta$ <sup>R130</sup> complex is enough to sustain limited diploid formation. As expected, HAG $\beta$ <sup>R130</sup> is unable to restore mating of the  $\Delta$ KIG $\alpha$  $\Delta$ KIG $\gamma$  strain (Figure 3).

#### Addition of a CCAAX Motif to KIG $\beta$ Bypasses Inactivation of KIG $\alpha$ and KIG $\gamma$ Subunits

The observation that a KIG $\beta$  subunit can remain functional in the absence of a KIG $\gamma$  subunit when the KIG $\alpha$  protein is present indicates that KIG $\beta$  can fold properly and with the KIG $\alpha$  help, find its functional site at the plasma membrane. This would implicate that artificial anchoring of KIG $\beta$  to the membrane will eliminate the need for both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$ . To test this hypothesis, we fused the coding region for the C-terminal seven residues from KIG $\gamma$  (SACCTIM) to the C-terminus of the HAG $\beta$  subunit. The HAG $\beta$ -CCAAX chimeric protein suppressed, although at a very limited level, the mating defect of the  $\Delta$ KIG $\alpha$  $\Delta$ KIG $\gamma$  double mutant (Figure 7A). This indicates that the addition of the CCAAX motif allows the KIG $\beta$  subunit to partially bypass lack of both KIG $\alpha$  and KIG $\gamma$  subunits. Immunodetection of the HAG $\beta$ -CCAAX protein with the HA antibody showed that a significant proportion of the protein was attached to the plasma membrane, although most protein remained in the cytosolic fraction (Figure 7B).

## DISCUSSION

*K. lactis* has two G $\alpha$  subunits (KIG $\alpha$ 1 and KIG $\alpha$ 2), one G $\beta$ , and one G $\gamma$ . Although KIG $\alpha$ 2 is implicated in the regulation of cAMP (Saviñón-Tejeda *et al.*, 1996), KIG $\alpha$ 1 and KIG $\beta$  are required for pheromone response (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2005). In this work, we investigated the

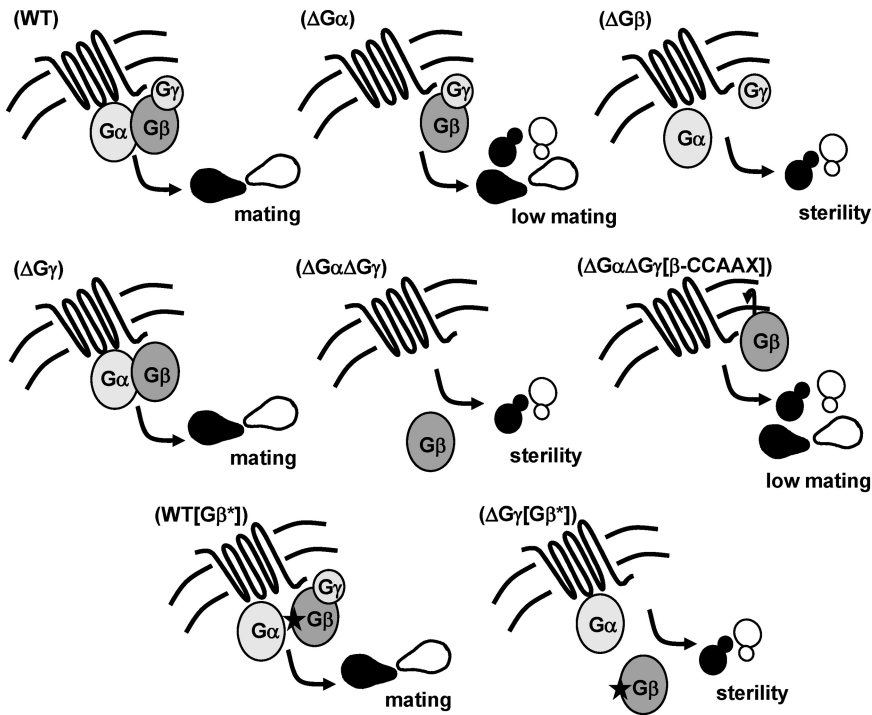


**Figure 7.** (A) Effect of the expression of G $\beta$ -CCAAX on mating of  $\Delta$ G $\alpha$  $\Delta$ G $\gamma$  mutant. Mating was done by replica-plating mutant strain  $\Delta$ G $\alpha$  $\Delta$ G $\gamma$  (carrying YEpkD alone or YEpkD-HASTE4-CCAAX plasmid) onto YPGal plate containing a lawn of MAT $\alpha$  cells (strain 12/8), followed by incubation overnight at 30°C. Diploid selection was done by replica-plating onto SD. Pictures were taken after 48-h incubation at 30°C. (B) Immunodetection of the KIG $\beta$ -CCAAX subunit.  $\Delta$ G $\alpha$  $\Delta$ G $\gamma$  cells expressing the chimeric HAG $\beta$ -CCAAX protein under the control of the GAL1 promoter (YEpkD plasmid) were fractionated as indicated in *Materials and Methods*. Fifteen micrograms of protein from the membrane (M) or cytosolic (C) fractions was resolved in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with either anti-HA or anti-Hog1.

role of the KIG $\gamma$  subunit in the mating pathway of *K. lactis*, and we have found that  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutants are fertile at near wild-type levels in crosses with wild-type cells. A slight defect in mating is observed only when the two mating partners lack the KIG $\gamma$  subunit. Accordingly with the phenotype displayed by the  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant, substitution of the Cys residue of the CAAX motif in KIG $\gamma$  has no effect on mating in *K. lactis*. In contrast, it has been shown that the G $\gamma$  subunit is essential for mating in *S. cerevisiae* and that the substitution of the Cys residue of its CAAX motif produces a dominant-negative phenotype (Grishin *et al.*, 1994; White-way and Thomas, 1994). Therefore, for the mating pathway of *K. lactis*, it is clear now that the heterotrimeric G protein has a unique signaling mechanism (Figure 8). The three subunits positively control the mating process; however, although the KIG $\beta$  is essential in mating and lack of KIG $\alpha$  impairs mating significantly, the KIG $\gamma$  subunit is practically dispensable. Thus, in this yeast species, KIG $\beta$  can activate mating in the presence of both subunits, or in the presence of either KIG $\alpha$  or KIG $\gamma$ . Additionally, a KIG $\beta$  protein with reduced KIG $\alpha$ -interaction can trigger mating efficiently in the presence of KIG $\gamma$ , but with very limited capacity in its absence (Figure 8). All these observations indicate that the main contribution of KIG $\gamma$  in the *K. lactis* signaling pathway is to enhance the membrane anchoring of KIG $\beta$  provided by KIG $\alpha$ .

In *S. cerevisiae*, both G $\beta$  and G $\gamma$  are required for activation of downstream elements and inactivation of G $\gamma$  prevents association of G $\beta$  with the scaffold protein Ste5p (Whiteway *et al.*, 1995). However our results indicate that in *K. lactis*, KIG $\beta$  can activate effector proteins in the absence of KIG $\gamma$ .

The fact that a heterotrimeric G protein can function as a heterodimer (G $\alpha$ G $\beta$ ) supports the proposed model of G



**Figure 8.** Role of G protein subunits in the *K. lactis* mating pathway. The three subunits of the trimeric protein play positive roles in the transmission of the pheromone stimulus. Although the  $G\beta$  subunit is the main transducer,  $G\alpha$  is required to some degree, and  $G\gamma$  is dispensable. To be active,  $G\beta$  has to be tethered to the membrane by action of  $G\alpha$  and/or  $G\gamma$ . Soluble  $G\beta$  is unable to activate the mating system.  $G\beta$  fused to a CCAAX motif (curved arrow) partially bypasses lack of  $G\alpha$  and  $G\gamma$ .  $G\beta$  subunit defective in its interaction with  $G\alpha$  (indicated by the black star) can function only in presence of  $G\gamma$ .

protein subunits evolution, i.e., via the sequential addition of first  $G\beta$  and then  $G\gamma$  subunit (Harashima and Heitman, 2002). However, mutant cells lacking  $G\gamma$  are less mating competent when they have to compete with wild-type cells. The slight disadvantage in mating of  $\Delta KIG\gamma$  mutants may exert selective pressure to maintain a  $G\gamma$  gene in *K. lactis*.

Heterotrimeric G proteins functioning in mating have been described in other yeast species. For example, *Candida albicans* has two  $G\alpha$  subunits, one  $G\beta$ , and one  $G\gamma$ . Although  $G\alpha_2$  is implicated in cAMP signaling and mating (Bennett and Johnson, 2006),  $G\alpha_1$  and the  $G\beta\gamma$  dimer are required for the pheromone response pathway. Loss of either  $G\alpha_1$  or  $G\beta$  produces full sterility (Dignard *et al.*, 2008), but effects of  $G\gamma$  inactivation remain to be investigated. *Cryptococcus neoformans* contains three  $G\alpha$  subunits, one  $G\beta$ , and two  $G\gamma$ s.  $G\alpha_1$  regulates cAMP signaling (Alspaugh *et al.*, 1997), whereas  $G\alpha_2$  and  $G\alpha_3$  have opposite roles in response to pheromones.  $G\alpha_2$  activates mating, whereas  $G\alpha_3$  inhibits mating (Hsueh *et al.*, 2007). Inactivation of  $G\beta$  or  $G\gamma_2$  totally eliminates mating, whereas  $G\gamma_1$  inactivation diminishes it (Wang *et al.*, 2000; Hsueh *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Overall, fungal species show a variety of mechanisms to activate mating using practically the same protein repertoire.

In the case of *S. pombe* the heterotrimeric G protein formed by  $G\alpha_2$ ,  $G\beta$ , and  $G\gamma$  is not involved in mating but participates in the glucose sensing pathway and activates adenylate cyclase (Landry *et al.*, 2000; Welton and Hoffman, 2000; Landry and Hoffman, 2001), whereas the pheromone signaling system is regulated by  $G\alpha_1$  alone and it seems that  $G\beta\gamma$  has no role in this process (Ladds *et al.*, 2005; Shpakov and Pertseva, 2008).

Because deletion of  $KIG\gamma$  has no effect on mating in *K. lactis* and  $G\gamma^{S87}$  seems to be inert, it could be that  $KIG\beta$  and  $KIG\gamma$  do not form a dimeric complex. However, several observations indicate that these subunits can interact in vivo. First, the limited ability of the  $\Delta KIG\alpha$  mutant to form diploids is totally eliminated when  $KIG\gamma$  is inactivated, indicating that in the absence of  $KIG\alpha$ ,  $KIG\gamma$  is needed for the

activation of  $KIG\beta$ ; second, mating efficiency drops to 50–60% when  $G\gamma$  is disrupted in both mating partners, and third,  $KIG\gamma$  and  $KIG\beta$  can physically associate in the two-hybrid assay. Moreover, analyses of  $KIG\beta\gamma$  dimers deduced by protein modeling, suggests that  $KIG\beta$  and  $KIG\gamma$  conserve the structural features to form a dimer complex. Therefore we think that in *K. lactis*, the  $KIG\beta$  and  $KIG\gamma$  subunits form a stable complex in vivo, but, nonetheless, this complex is not essential for  $KIG\beta$  activation and mating response. A similar situation has been reported in *S. pombe*, where the  $G\beta$  subunit remains partially functional without a  $G\gamma$  subunit; however the structure of these proteins present atypical features. The  $G\beta$  subunit  $Git5$ , lacks the N-terminal amphipathic helix present in most  $G\beta$  subunits (Landry *et al.*, 2000; Shpakov and Pertseva, 2008), and the  $G\gamma$  subunit  $Git11$ , has no N-terminal helix with the heptad periodicity capable of forming coiled-coil structures (Landry and Hoffman, 2001).

Other proteins with a similar structure to the  $G\beta$  subunits that regulate G protein function have been described. In *S. pombe* there is  $Gnr1p$ , a WD-40 repeat protein that adopts a structure similar to typical  $G\beta$  subunits.  $Gnr1p$  is a negative regulator of the function of  $G\alpha_1$  in the mating pathway in *S. pombe*, but is not required for signaling (Goddard *et al.*, 2006). It appears that  $Gnr1p$  acts as a structural mimic of  $G\beta$  in the absence of a  $G\gamma$  subunit. In *S. cerevisiae* there are the so called kelch repeat proteins that lack the WD-40 repeat motifs but resemble the typical  $G\beta$  propeller. The kelch proteins  $Gpb1p$  and  $Gpb2p$  regulate cAMP signaling by inhibiting  $G\alpha_2$  activity (Harashima and Heitman, 2002).

Plasma membrane anchoring of the heterotrimeric G protein is a prerequisite for transduction of the pheromone stimulus to intracellular effectors in *S. cerevisiae*. To ensure membrane targeting of the G protein, the  $G\alpha$  subunit is N-myristoylated and S-palmitoylated, and the  $G\gamma$  is farnesylated and S-palmitoylated (Dohman and Thorner, 2001). Although inhibition of either  $G\alpha$  modifications in *S. cerevisiae* results in partial release of  $G\beta\gamma$ , it has been observed that some  $G\beta\gamma$  dimers remain attached to the membrane,



inducing constitutive signaling (Hirschman *et al.*, 1997). On the other hand, inhibition of G $\gamma$  farnesylation results in a sterile phenotype, whereas inhibition of G $\gamma$ -S-palmitoylation significantly reduces its function (Whiteway and Thomas, 1994; Dohlman and Thorner, 2001). Additionally, association of G $\beta$  to membranes is almost entirely dependent on the presence of G $\gamma$  (Hirschman *et al.*, 1997), indicating that G $\alpha$  is not sufficient for G $\beta$  targeting in *S. cerevisiae*. Thus, a striking observation made in this work is that the lack of KIG $\gamma$  has no apparent effect on the signal transduction during pheromone response in *K. lactis* as long as a functional KIG $\alpha$  is present, indicating that in this system, KIG $\beta$  can be targeted to the membrane by its interaction with KIG $\alpha$ . At present we do not know why this is different in *S. cerevisiae*; however, analysis of the interaction surfaces between G $\alpha$  and G $\beta$  deduced from the structural models of both species indicates that the hydrophobic interaction area in the *K. lactis* G $\alpha$ /G $\beta$  complex is 1270 Å<sup>2</sup> larger than that of *S. cerevisiae*. This may suggest that the G $\alpha$ /G $\beta$  interface is more stable in *K. lactis*. This assumption is supported by the following observation: the substitution of Trp136 by Arg in G $\beta$  of *S. cerevisiae* created an allele that produces a haploid lethal phenotype (Hpl), and no compensatory mutations in G $\alpha$  were found that suppressed the lethality induced by G $\beta$ R<sup>136</sup>, suggesting that this mutant G $\beta$  has lost complete interaction with G $\alpha$  (Whiteway *et al.*, 1994), whereas the substitution of the equivalent residue (Trp130) in *K. lactis* diminished G $\alpha$ -G $\beta$  interaction, but did not totally eliminate it. Modeling of the G $\beta$  subunits of *S. cerevisiae* and *K. lactis* with Arg instead of Trp at positions 136 and 130, respectively, indicates that in both cases, the side chain of the Arg residue is too large to fit in the space occupied by Trp. This is enough to disrupt the interaction between G $\alpha$  and G $\beta$  in *S. cerevisiae* but not in *K. lactis*, confirming that the G $\alpha$ G $\beta$  complex in *K. lactis* is more stable. Further studies will be required to find out which structural features make the G $\alpha$ -G $\beta$  interaction stronger in *K. lactis*, making the G $\gamma$  subunit dispensable for the pheromone response pathway.

It has been found that the dimeric G $\beta\gamma$  complex in *S. cerevisiae* is located mostly in plasma membranes, but a significant proportion associates with internal cell membranes and with the cytosolic fraction (Hirschman *et al.*, 1997). The differential distribution of the G $\beta\gamma$  dimer could be explained by the existence of intermediates in the assembly and/or trafficking itinerary (Michaelson *et al.*, 2002). However, in mutant cells devoid of G $\gamma$ , G $\beta$  fails to associate with any cell membrane, becomes unstable, and is rapidly degraded; whereas inactivation of the G $\alpha$  subunit diminishes G $\beta$  association with the plasma membrane (Schmidt and Neer, 1991; Hirschman *et al.*, 1997). In contrast, we have found that the KIG $\beta$  subunit is associated with membranes in *K. lactis* cells devoid of the KIG $\gamma$  subunit, and when the KIG $\alpha$  is also eliminated, KIG $\beta$  fails to sediment with membranes and fractionates with the cytosol. Although our preparation is highly enriched with plasma membrane, we did not differentiate between pools of G $\beta$  associated to different membrane fractions, and we did not measure protein stability and turnover; thus, we were unable to determine to what extent, if any, the G $\beta$  is altered in its stability and trafficking in the mutant strains. However, we expressed KIG $\beta$  from a plasmidic vector with constant promoter induction in our mutant strains, and we assume that most of the KIG $\beta$  produced should be correctly targeted in the plasma membrane in the  $\Delta$ KIG $\beta\Delta$ KIG $\gamma$  cells because they mated at almost wild-type level.

Interestingly, an artificial KIG $\beta$  subunit containing the CCAAX motif from the G $\gamma$  subunit is able to attach to the

membrane and stimulates the mating pathway even in the absence of both G $\alpha$  and G $\gamma$  subunits, although at very limited level (Figure 8). The impaired signaling activity of G $\beta$ -CCAAX may be due to conformational constraints on the protein that affect proper folding, to deficient coupling with the receptor and hence improper activation of the G $\beta$  protein, and/or a deficient association with effector proteins, such as Ste20p or Ste5p.

In conclusion, we have described that the G $\beta$  subunit activates a signaling system in the absence of a canonical G $\gamma$  protein in the  $\Delta$ KIG $\gamma$  mutant which demonstrates that, in *K. lactis*, the formation of a G $\beta\gamma$  complex is not required to activate the mating cascade, which is distinct from the established paradigm of G $\beta\gamma$  function. However, this does not rule out the need of a G $\beta\gamma$  dimer to regulate other, yet unknown, signaling pathways in *K. lactis*.

The observation that the mating pathway in *K. lactis* can operate without a canonical G $\beta\gamma$  dimer may constitute a landmark in the evolution of G protein–signaling systems. It will be of utmost interest to determine whether this is the case in closely related yeast species or is a feature confined only to *K. lactis*.

The prominent role that *S. cerevisiae* has played in all research areas has led to the incorrect use of the term yeast as being synonymous with *S. cerevisiae*. However, yeast species differ in many properties such as morphology, carbon and nitrogen metabolism, regulation of fermentation and respiration, and—as has been shown in this work—sexual reproduction. Therefore, some paradigms emerging from *S. cerevisiae* should not be universally applied for all yeast species.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guadalupe Codiz and Minerva Mora (Molecular Biology Unit, IFC) for technical assistance and the staff of the Computer Unit, IFC. We also thank Miguel Shingu and Marisela Bolaños for technical assistance. This work was partially funded by Grants 44178 from CONACyT, México and IN211906 from PAPIIT, DGAPA, UNAM. R.N. was supported by a PhD fellowship from CONACyT. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Ciencias Biomédicas of R.N.

## REFERENCES

- Alspaugh, J. A., Perfect, J. R., and Heitman, J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev.* 11, 3206–3217.
- Bennett, R. J., and Johnson, A. D. (2006). The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Mol. Microbiol.* 62, 100–119.
- Blumer, K. J., and Thorner, J. (1990).  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of a yeast guanine nucleotide-binding protein are not essential for membrane association of the  $\alpha$  subunit but are required for receptor coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4363–4367.
- Breitkreutz, A., Boucher, L., and Tyers, M. (2001). MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Curr. Biol.* 11, 1266–1271.
- Clapham, D. E., and Neer, E. J. (1993). New roles for G-protein beta gamma dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403–406.
- Dietzel, C., and Kurjan, J. (1987). The yeast Scg1 gene: a G $\alpha$ -like protein implicated in the  $\alpha$ - and  $\alpha$ -factor response pathway. *Cell* 50, 1001–1010.
- Dignard, D., André, D., and Whiteway, M. (2008). Heterotrimeric G-protein subunit function in *Candida albicans*: both the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the pheromone response G protein are required for mating. *Eukaryot. Cell* 7, 1591–1599.
- Dohlman, H. G., and Thorner, J. W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 703–754.
- Eliou, E. A., Satterberg, B., and Kranz, J. E. (1993). FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell* 4, 495–510.

- Goddard, A., Ladds, G., Forfar, R., and Davey, J. (2006). Identification of Gnr1p, a negative regulator of  $G\alpha$  signalling in *Schizosaccharomyces pombe*, and its complementation by human  $G\beta$  subunits. *Fungal Genet. Biol.* 43, 840–851.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I., Gyuris, J., and Brent, R. (1997). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 4*, 4.4.1–4.4.36.
- Grishin, A. V., Weiner, J. L., and Blumer, K. L. (1994). Biochemical and genetic analysis of dominant-negative mutations affecting a yeast G-proteins  $\gamma$  subunit. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4571–4578.
- Harashima, T., and Heitman, J. (2002). The  $G\alpha$  protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic  $G\beta$  subunits. *Mol. Cell* 10, 163–173.
- Hirschman, J. E., De Zutter, G. S., Simonds, W. F., and Jenness, D. D. (1997). The  $G\beta\gamma$  complex of the yeast pheromone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 240–248.
- Hirschman, J. E., and Jenness, D. D. (1999). Dual lipid modification of the yeast  $G\gamma$  subunit Ste18p determines membrane localization of  $G\beta\gamma$ . *Mol. Cell. Biol.* 19, 7705–7711.
- Hsueh, Y.-P., Xue, C., and Heitman, J. (2007). G protein signaling governing cell fate decisions involves opposing  $G\alpha$  subunits in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* 18, 3237–3249.
- Inouye, C., Dhillon, N., and Thorner, J. (1997). Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4-promoted oligomerization for yeast pheromone signaling. *Science* 278, 103–106.
- Kawasaki, L., Saviñón-Tejeda, A. L., Ongay-Larios, L., Ramírez, J., and 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.
- Kawasaki, L., Castañeda-Bueno, M., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala, N., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L., and Coria, R. (2008). Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 7, 78–85.
- Ladds, G., Goddard, A., and Davey, J. (2005). Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast. *Trends Biotechnol.* 23, 367–373.
- Landry, S., Pettit, M., Apolinario, A., and Hoffman, C. S. (2000). The fission yeast *git5* gene encodes a  $G\beta$  subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* 154, 1463–1471.
- Landry, S., and Hoffman, C. S. (2001). The *git5*  $G\beta$  and *git11*  $G\gamma$  form an atypical  $G\beta\gamma$  dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway. *Genetics* 157, 1159–1168.
- Leberer, E., Dignard, D., Thomas, D. Y., and Leeuw, T. A. (2000). A conserved  $G\beta$  binding (GBB) sequence motif in Ste20p/PAK family protein kinases. *Biol. Chem.* 381, 427–431.
- Li, L., Shen, G., Zhang, Z. G., Wang, Y. L., Thompson, J. K., and Wang, P. (2007). Canonical heterotrimeric G proteins regulating mating and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* 18, 4201–4209.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., III, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C-alpha geometry: phi, psi, and C-beta deviation. *Proteins* 50: 437–450.
- Manahan, C. L., Patnana, M., Blumer, K. J., and Linder, M. E. (2000). Dual lipid modification motifs in  $G\alpha$  and  $G\gamma$  subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 957–968.
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291–325.
- Miyajima, I., Nakafuku, M., Nakayama, N., Brenner, C., Miyajima, A., Kaibuchi, K., Arai, K., Kaziro, Y., and Matsumoto, K. (1987). GPA1, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction. *Cell* 50, 1011–1019.
- Michaelson, D., Ahearn, I., Bergo, M., Young, S., and Philips, M. (2002). Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and golgi. *Mol. Biol. Cell* 13, 3294–3302.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249–257.
- Olson, K. A., Nelson, C., Tai, G., Hung, W., Yong, C., Astell, C., and Sadowski, I. (2000). Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-responsive transcription by separate mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4199–4209.
- Ongay-Larios, L., Saviñón-Tejeda, A., Williamson, M., Durán-Avelar, M. J., and Coria, R. (2000). The Leu132 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 Lett.* 467, 22–26.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Saviñón-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Ramírez, J., and Coria, R. (1996). Isolation of a gene encoding a G protein  $\alpha$  subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 12, 1125–1133.
- Saviñón-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Valdés-Rodríguez, J., and Coria, R. (2001). The *KlGpa1* gene encodes a G-protein  $\alpha$  subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 183, 229–234.
- Scannell, D. R., Butler, G., and Wolfe, K. H. (2007). Yeast genome evolution—the origin of species. *Yeast* 24, 929–942.
- Schmidt, C. J., and Neer, E. J. (1991). In vitro synthesis of G protein  $\beta\gamma$  dimers. *J. Biol. Chem.* 266, 4538–4544.
- Shpakov, A., and Pertseva, M. N. (2008). Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 269, 151–282.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. J., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a G-protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369–374.
- Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer  $G\alpha 1\beta 1\gamma 2$ . *Cell* 83, 1047–1058.
- Wang, P., Perfect, J. R., and Heitman, J. (2000). The G-protein beta subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 352–362.
- Welton, R. M., and Hoffman, C. S. (2000). Glucose monitoring in fission yeast via the *gpa2*  $G\alpha$ , the *git5*  $G\beta$ , and the *git3* putative glucose receptor. *Genetics* 156, 513–521.
- Westfall, P. J., Patterson, J. C., Chen, R. E., and Thorner, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 12212–12217.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D. Y., Bell, L., Saari, G. C., Grant, F. J., O'Hara, P., and MacKay, V. L. (1989). The Ste4 and Ste18 genes of yeast encode potential  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* 56, 467–477.
- Whiteway, M., and Thomas, D. Y. (1994). Site-directed mutations altering the CAAX box of Ste18, the yeast pheromone-response pathway  $G\gamma$  subunit. *Genetics* 137, 967–976.
- Whiteway, M., Clark, K. L., Leberer, E., Dignard, D., and Thomas, D. Y. (1994). Genetic identification of residues involved in association of  $\alpha$  and  $\beta$  G-protein subunits. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3223–3229.
- Whiteway, M., Wu, C., Leeuw, T., Clark, K., Fourest-Lieuvin, A., Thomas, D. Y., and Leberer, E. (1995). Association of the yeast pheromone response G protein  $\beta\gamma$  subunits with the MAP Kinase scaffold Ste5p. *Science* 269, 1572–1575.
- Zhang, F. L., and Casey, P. J. (1996). Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *Biochem J.* 320, 925–932.
- Zheng, Y., Cerione, R., and Bender, A. (1994). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* 269, 2369–2372.