



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

Señalización diferencial inducida por el par feromona-receptor de  
*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LILIANA ELIZABETH RONCES FRUTOS**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. GABRIEL DEL RÍO GUERRA (INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ (INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM)

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS, UNAM)

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2014



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.

# **Señalización diferencial inducida por el par feromona-receptor de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata***

## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel Del Río Guerra, en el laboratorio 205-Oriente, en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Gabriel Del Río Guerra	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Abraham Landa Piedra	Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Durante los estudios de Maestría gocé de la beca número 245842 otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis, así como con el apoyo de la DGAPA a través del proyecto PAPIIT número IN205911. Agradezco a la Dra. María Teresa Lara Ortiz por el apoyo técnico durante la elaboración de este trabajo, así como al Instituto de Fisiología Celular, al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades otorgadas.

## ÍNDICE

---

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1 Par Feromona-Receptor .....	7
2.2 Sistema de señalización de la feromona en levaduras.....	12
2.3 Consecuencias de la señalización de feromona.....	16
2.3.1 Arresto del ciclo celular .....	16
2.3.2. Formación del fenotipo <i>shmoo</i> .....	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
6.1 Materiales .....	23
6.1.1 Especímenes biológicos.....	23
6.1.2 Enzimas.....	24
6.1.3 Oligonucleótidos.....	24
6.1.4 Vectores de clonación .....	24
6.1.5 Péptidos .....	25
6.1.6 Soluciones comerciales.....	25
6.1.7 Equipo .....	26
6.2 Metodología.....	26
6.2.1 Extracción de DNA genómico de <i>C. glabrata</i> .....	26
6.2.2 Amplificación del gen <i>CgSTE2</i> de <i>C. glabrata</i> .....	27
6.2.3 Clonación de <i>CgSTE2</i> en un vector intermedio.....	28
6.2.4 Generación de la construcción pBC176/ <i>CgSTE2</i> .....	33
6.2.5 Expresión del receptor Ste2p de <i>C. glabrata</i> en <i>S. cerevisiae</i> .....	39
6.2.6 Ensayos con la feromona $\alpha$ de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. glabrata</i> .....	41

---

---

6.2.7 Comparación de los componentes de la vía de señalización de la feromona en levaduras .....	45
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
7.1 Construcción del vector pBC176/CgSTE2.....	48
7.2 Expresión del receptor Cgste2p en <i>S. cerevisiae</i> .....	57
7.3 Ensayos con la feromona $\alpha$ de <i>S. cerevisiae</i> y de <i>C. glabrata</i> .....	60
7.3.1 Arresto del ciclo celular .....	60
7.3.2 Formación del fenotipo <i>shmoo</i> .....	63
7.3.3 Apareamiento entre células haploides .....	65
7.4 Comparación de los componentes de la vía de señalización de la feromona en levaduras.....	67
7.4.1 Análisis de secuencias .....	67
7.4.2 Comparación de dominios.....	70
7.4.3 Perfil filogenético .....	76
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>80</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>88</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>89</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>91</b>
A. Soluciones.....	91
B. Medios de cultivo .....	94
C. Protocolos .....	97
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	<b>104</b>

---

## **1. RESUMEN**

*Candida glabrata* había sido considerada como un hongo poco patógeno presente en la flora habitual de individuos sanos. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la incidencia de infecciones sistémicas causadas por esta levadura, convirtiéndose en la segunda causa más común de candidiasis oral y vaginal. A pesar de ser considerada una levadura asexual, diversos estudios filogenéticos han demostrado que *C. glabrata* posee una relación evolutiva estrecha con *Saccharomyces cerevisiae* ya que la mayoría de sus genes posee un homólogo en esta última levadura, incluyendo los implicados en la diferenciación y apareamiento sexual.

En *S. cerevisiae*, el proceso de apareamiento está regulado por la expresión y señalización de las feromonas  $\alpha$  y  $a$  mediante una vía estudiada a gran detalle. Para tratar de entender la capacidad reproductiva de *C. glabrata*, se llevó a cabo la expresión heteróloga de su receptor para la feromona  $\alpha$  (CgSte2p) en *S. cerevisiae* y se evaluó la capacidad de dicho receptor para unirse a esta feromona y activar la vía de señalización que conduce al apareamiento sexual. Asimismo, se comparó el resto de las proteínas que forman parte de esta vía en *S. cerevisiae* con sus homólogas en *C. glabrata* y otras levaduras, a fin de esclarecer cuál o cuáles de los componentes de este mecanismo son los responsables de la señalización diferencial observada en *C. glabrata*.

Los resultados generados durante este trabajo sugieren que CgSte2p es capaz de reconocer a la feromona  $\alpha$  (tanto de *S. cerevisiae* como de *C. glabrata*) y activar la vía de señalización, generando una respuesta parcial que no conduce al apareamiento de las células. Además, se observó que el receptor es más afín a la feromona de *C. glabrata* que a la de *S. cerevisiae*, sugiriendo que la unión del par feromona-receptor es específica para cada especie.

Por su parte, el análisis y comparación de los demás componentes de la vía nos permitió identificar un grupo de proteínas que, debido a la considerable diferencia respecto a sus homólogas en *S. cerevisiae*, podrían estar llevando a cabo una función distinta a la requerida para la reproducción sexual. La mayor diferencia se observó en las proteínas CgSte5p, CgFar1p y CgFus1p, señalándolas, junto con el receptor CgSte2p, como posibles responsables del comportamiento asexual de *C. glabrata*.

## **2. INTRODUCCIÓN**

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura, un hongo unicelular perteneciente al grupo de los ascomicetos. Este grupo incluye más de 60,000 especies, entre ellas, hongos patógenos como los pertenecientes al género *Candida*<sup>1</sup>. *S. cerevisiae* posee una gran similitud con los sistemas celulares fundamentales de organismos superiores (división celular, cromosomas, respuesta al estrés y metabolismo primario, entre otros), lo que la ha consolidado como un modelo eucariota a nivel celular y molecular, así como una herramienta tecnológica para la biología molecular<sup>2</sup>.

Por otro lado, *Candida glabrata* había sido considerada como un hongo poco patógeno presente en la flora habitual de individuos sanos. Sin embargo, debido al aumento en el uso de terapia inmunosupresiva junto con el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, la frecuencia de infecciones sistémicas causadas por *C. glabrata* ha incrementado considerablemente en los últimos años, convirtiéndose en la segunda causa más común de candidiasis oral y vaginal<sup>3</sup>.

Dentro del género *Candida*, *C. glabrata* es la especie más relacionada evolutivamente a *S. cerevisiae*<sup>4</sup>. Según diversos estudios filogenéticos realizados en levaduras, *C. glabrata* comparte un ancestro común con muchas especies de *Saccharomyces* mientras que no sucede lo mismo con otras especies de *Candida*<sup>5</sup> (figura 1). Como evidencia de esta relación, alrededor del 40% de los genes de *S. cerevisiae* poseen ortólogos en *C. glabrata*<sup>6,7</sup>. Este dato se observa con mayor claridad en la tabla 1, en la cual se muestra la proporción de genes ortólogos encontrados en *C. glabrata* con respecto a los genes de *S. cerevisiae* que han sido agrupados en cada una de las categorías establecidas por la base de datos YPD (Yeast Proteome Database)<sup>7</sup>.

A pesar de esta similitud general, existen diferencias en relación a su contenido de genes ya que *C. glabrata* muestra una considerable pérdida de estos en comparación con su ancestro común, lo que podría deberse a su adaptación como patógeno comensal y oportunista en mamíferos<sup>6</sup>.

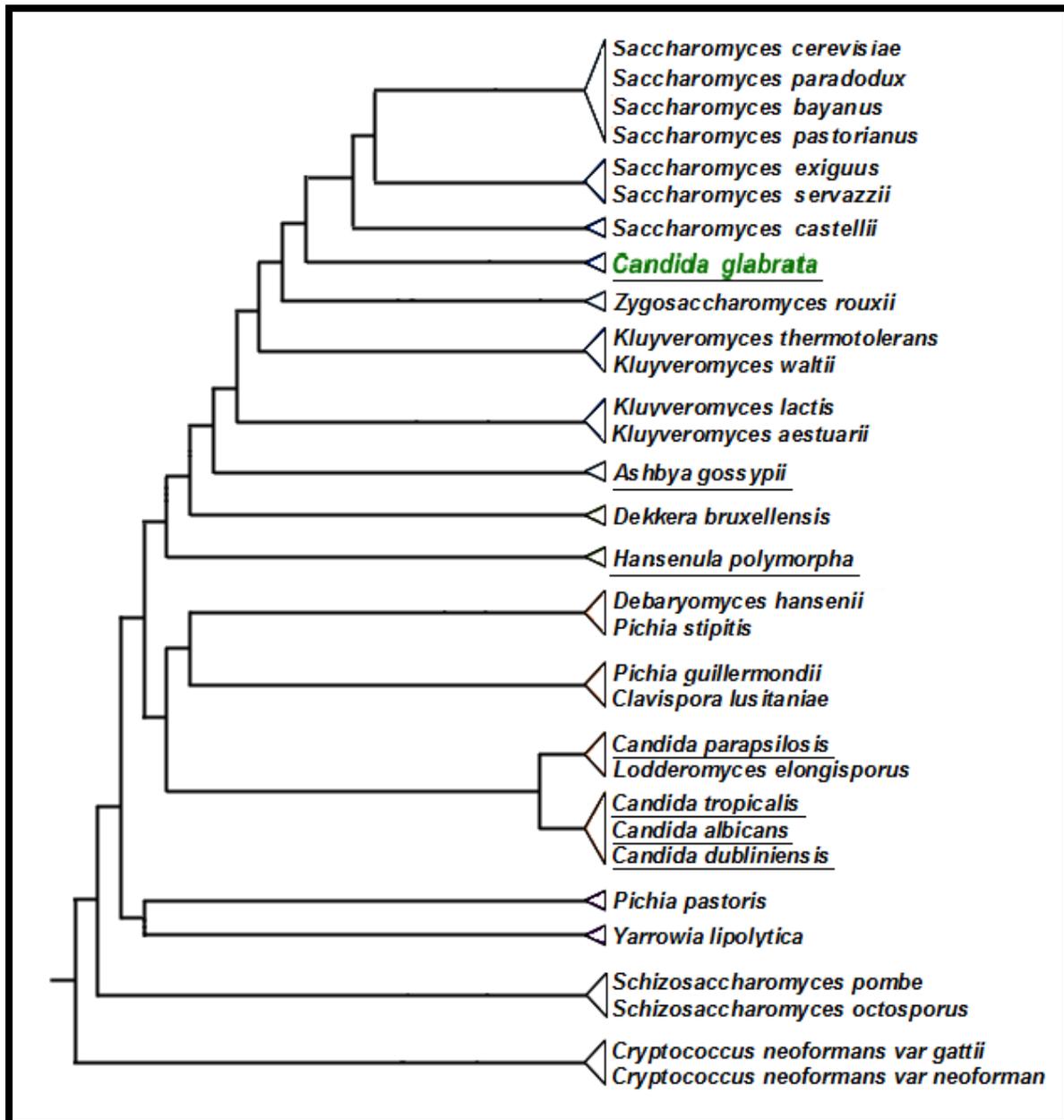


Fig. 1. Árbol filogenético de las levaduras más conocidas basado en el análisis de sus secuencias genómicas, tomado de la base de datos Génolevures (<http://genolevures.org/yeastgenomes.html#phylo>). En él se observa que *C. glabrata* posee una relación más estrecha con *S. cerevisiae* que con otros hongos patógenos, incluyendo otras especies de *Candida*. Las especies que presentan un ciclo de reproducción asexual se encuentran subrayadas.

Tabla 1. Número de genes ortólogos de *C. glabrata* respecto a *S. cerevisiae* encontrados para cada categoría de la *Yeast Proteome Database*

<b>Clasificación según YPD</b>	<b>C. glabrata</b>	<b>S. cerevisiae</b>	<b>Cg/Sc</b>	<b>Clasificación según YPD</b>	<b>C. glabrata</b>	<b>S. cerevisiae</b>	<b>Cg/Sc</b>
Control del ciclo celular	96	213	0.45	Procesamiento de RNA	126	280	0.45
Envejecimiento	16	39	0.41	Empalme de RNA	44	116	0.38
Estrés celular	98	331	0.30	Síntesis de proteínas	99	373	0.27
Polaridad celular	91	216	0.42	Degradación de proteínas	86	183	0.47
Adhesión celular	1	4	0.25	Plegamiento de proteínas	33	91	0.36
Estructura celular	51	120	0.4	Modificación de proteínas	99	246	0.40
Diferenciación	36	104	0.35	Translocación de proteínas	37	87	0.43
Citocinesis	21	40	0.53	Ensamblaje de complejos proteicos	22	47	0.47
Apareamiento	45	132	0.34	Generación de energía	107	290	0.37
Meiosis	56	147	0.38	Metabolismo de carbohidratos	70	254	0.28
Mitosis	72	147	0.49	Metabolismo de aminoácidos	92	217	0.42
Fusión membranal	15	40	0.38	Metabolismo de lípidos	76	206	0.37
Síntesis de DNA	53	104	0.51	Metabolismo de nucleótidos	26	95	0.27
Reparación de DNA	59	154	0.38	Metabolismo de fosfatos	8	26	0.31
Recombinación	29	88	0.33	Otros metabolismos	62	192	0.32
Transcripción mitocondrial	3	5	0.60	Transporte de moléculas pequeñas	138	407	0.34
Transcripción de Pol I	14	30	0.47	Transporte vesicular	136	305	0.45
Transcripción de Pol II	148	384	0.39	Traducción de señales	54	135	0.40
Transcripción de Pol III	15	39	0.38	Otros	27	57	0.47

Cg/Sc corresponde a la proporción de genes de *S. cerevisiae* que poseen ortólogos en *C. glabrata* para cada clasificación de YPD.

Asimismo, se sabe que *C. glabrata* es una levadura haploide y asexual en contraste con *S. cerevisiae*, la cual posee un ciclo sexual además de poder alternar entre una forma haploide y diploide<sup>4</sup>. Sin embargo, algunos análisis genéticos en *C. glabrata* revelan la presencia de genes implicados en la conjugación y diferenciación sexual y de tres loci tipo MAT (MTL), con una configuración similar a la del locus MAT de *S. cerevisiae*<sup>8</sup>. Este locus codifica, en *S. cerevisiae*, para los factores de transcripción encargados de regular la expresión de los genes específicos **a** y  $\alpha$  implicados en la expresión y reconocimiento de la feromona y la cascada de transducción<sup>9,10</sup>.

Muchos de los genes que están involucrados en el proceso de apareamiento y reproducción en *S. cerevisiae* también se encuentran en el genoma de *C. glabrata* (tabla 2), incluyendo los genes responsables de la producción, secreción y respuesta a feromona, la cual es una molécula clave en el proceso de apareamiento y reproducción<sup>7,10-12</sup>.

Tabla 2. Algunos de los genes de *S. cerevisiae* involucrados en el apareamiento y reproducción sexual que cuentan con ortólogos en *C. glabrata*

<b>Gen</b>	<b>Función de la proteína</b>
<b>HO</b>	Endonucleasa necesaria para la conversión del locus MAT
<b>ASH1</b>	Inhibidor de la expresión de HO
<b>MFA1/ MFA2</b>	Precursores de la feromona <b>a</b>
<b>MFALPHA1/ MFALPHA2</b>	Precursores de la feromona $\alpha$
<b>STE2</b>	Receptor de la feromona $\alpha$
<b>STE3</b>	Receptor de la feromona <b>a</b>
<b>RAM1/RAM2</b>	Involucradas en la farnesilación de la feromona <b>a</b>
<b>STE24</b>	Requerida para la maduración y proteólisis de la feromona <b>a</b>
<b>RCE1</b>	Requerida para la maduración y proteólisis de la feromona <b>a</b>
<b>STE14</b>	Involucrada en la metilación de la feromona <b>a</b>
<b>STE23</b>	Requerida para la maduración y proteólisis de la feromona <b>a</b>
<b>AXL1</b>	Requerida para la maduración y proteólisis de la feromona <b>a</b>
<b>STE6</b>	Exportador de feromona <b>a</b>

Tabla 2. Continuación

<b>Gen</b>	<b>Función de la proteína</b>
<b>STE13</b>	Peptidasa, requerida para la maduración y procesamiento de la feromona $\alpha$
<b>KEX1/KEX2</b>	Requerida para la maduración y procesamiento de la feromona $\alpha$
<b>FIG4</b>	Inductor de feromona, fosfatasa
<b>FAR1</b>	Inhibidor del complejo Cln1p/2p- Cdc28p
<b>CDC24</b>	Factor de intercambio GTP-GDP para Cdc42p
<b>STE5</b>	Proteína adaptadora
<b>AKR1</b>	Regulador negativo de la vía de señalización de la feromona
<b>FUS3</b>	MAP cinasa, activador de Ste12p y Far1p
<b>STE12</b>	Factor de transcripción
<b>KAR5</b>	Involucrada en la regulación de la fusión de la membrana nuclear
<b>LSG1</b>	Requerido para morfología de apareamiento y esporulación
<b>OPY2</b>	Su sobreproducción bloquea arresto del ciclo celular inducido por feromona
<b>SAG1</b>	$\alpha$ -aglutinina de células $\alpha$

## 2.1 Par Feromona-Receptor

Las características genéticas y bioquímicas del proceso de apareamiento de *S. cerevisiae* han sido estudiadas en gran detalle. Esta levadura posee dos diferentes tipos celulares haploides, **a** y  $\alpha$ , los cuales están conferidos por los alelos MAT**a** y MAT $\alpha$  respectivamente. El apareamiento entre células de tipo opuesto genera un tercer tipo celular, el diploide **a**/ $\alpha$ <sup>13, 14</sup>.

El proceso de apareamiento comienza cuando las células **a** y  $\alpha$  secretan un péptido difusible denominado feromona **a** y feromona  $\alpha$  respectivamente (también conocidos como factor **a** y factor  $\alpha$ ). Las feromonas son reconocidas por un receptor específico en cada tipo celular de modo que, tal como se muestra en la figura 2, el factor  $\alpha$  se une al receptor de las células **a** (Ste2p) mientras que el factor **a** se une a un receptor distinto

localizado en las células  $\alpha$  (Ste3p)<sup>15</sup>. Las células que no producen feromona o que carecen de los receptores correspondientes, son estériles<sup>16</sup>.

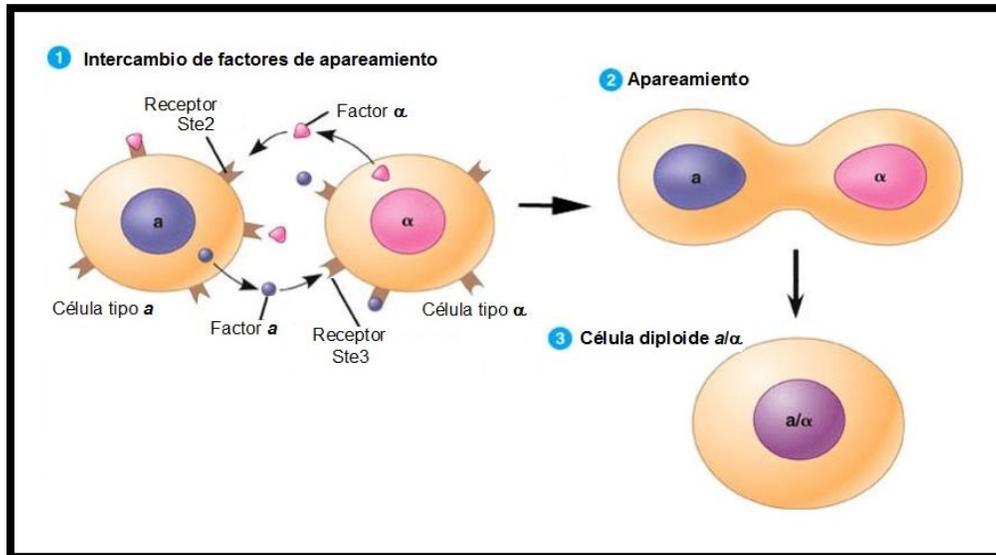


Fig. 2. Esquema del proceso de apareamiento en los tipos de células sexuales de *S. cerevisiae*. 1) Las células **a** producen feromona **a**, la cual es reconocida por un receptor específico en las células  $\alpha$ . Por su parte, las células  $\alpha$  producen la feromona  $\alpha$  que será reconocida por un receptor distinto localizado en las células **a**. 2) Una vez reconocida la feromona, las células sufren una serie de cambios que favorecen su apareamiento. 3) Como resultado del apareamiento, se genera una nueva célula diploide **a/** $\alpha$ . Imagen modificada de Hodnett-Ap<sup>17</sup>.

El factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* es un tridecapéptido sintetizado constitutivamente por las células  $\alpha$ . Por su parte, el factor **a** es un dodecapéptido modificado postraduccionalmente con un grupo farnesil isoprenol y un grupo carboximetil<sup>16</sup>. Varios estudios sugieren que los residuos del extremo amino terminal de la feromona  $\alpha$  (dominio de señalización) ayudan a estabilizar la forma activa del receptor Ste2p permitiendo el inicio de la señalización, mientras que los residuos del extremo carboxilo terminal (dominio de unión) juegan un papel importante en la unión al receptor y su activación. Por otro lado, los aminoácidos de la región central de la feromona (dominio de giro) son críticos para su actividad biológica ya que favorecen que la molécula adquiera una conformación que le permita orientar los dominios de unión y señalización<sup>16, 18</sup> (figura 3).

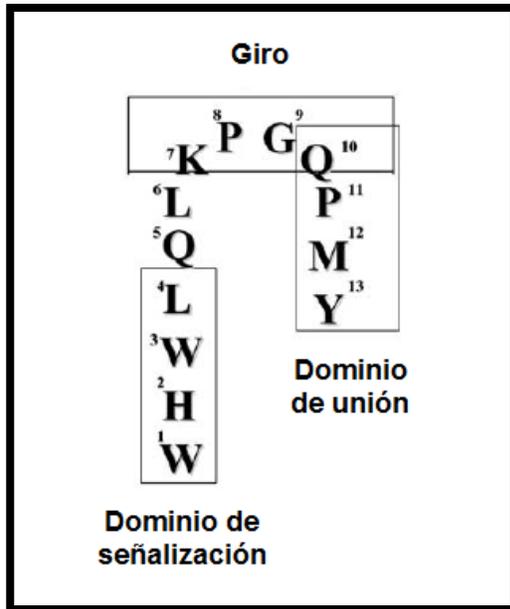


Fig. 3. Esquema que representa los dominios funcionales de la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. La imagen sugiere que la feromona puede dividirse en tres dominios (señalización, unión y giro conformacional), donde los residuos pertenecientes a cada uno contribuyen de manera importante en la función asignada. Imagen tomada de Naider F. (2004)<sup>16</sup>.

En el caso de *C. glabrata*, se identificaron tres péptidos candidatos a feromona  $\alpha$  al secuenciar y traducir los genes ortólogos correspondientes. Dos de ellos poseen secuencias idénticas (secuencia A) pero el tercero difiere en dos aminoácidos<sup>7, 11</sup> (secuencia B). Las dos diferentes secuencias de estos péptidos se muestran en la figura 4.

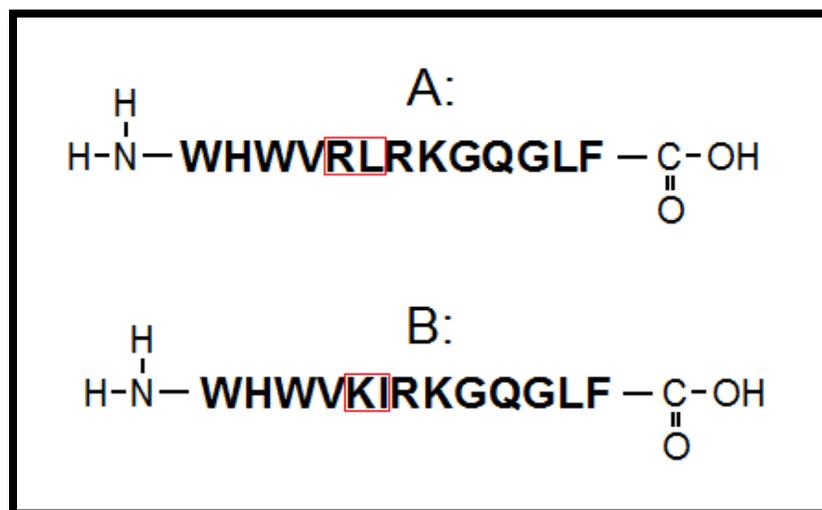


Fig. 4. Secuencias encontradas para la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*. Las secuencias difieren en los aminoácidos de las posiciones 5 y 6 (arginina y leucina en la secuencia A, lisina e isoleucina en la secuencia B).

Por su parte, el receptor para la feromona  $\alpha$  (Ste2p) pertenece a la amplia familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés), los cuales incluyen receptores para hormonas, neurotransmisores y estímulos sensoriales en diversos eucariotas. La principal función de los GPCRs consiste en captar y transformar estímulos en respuestas intracelulares específicas a través de las interacciones con proteínas G<sup>19,20</sup>. Los receptores GPCRs están constituidos por siete dominios transmembranales conectados por asas extra e intracelulares (figura 5). Además, estos receptores poseen una organización similar de sus dominios funcionales. Por ejemplo, en muchos GPCRs la tercera asa intracelular permite la unión del receptor a la proteína G<sup>20, 21</sup>.

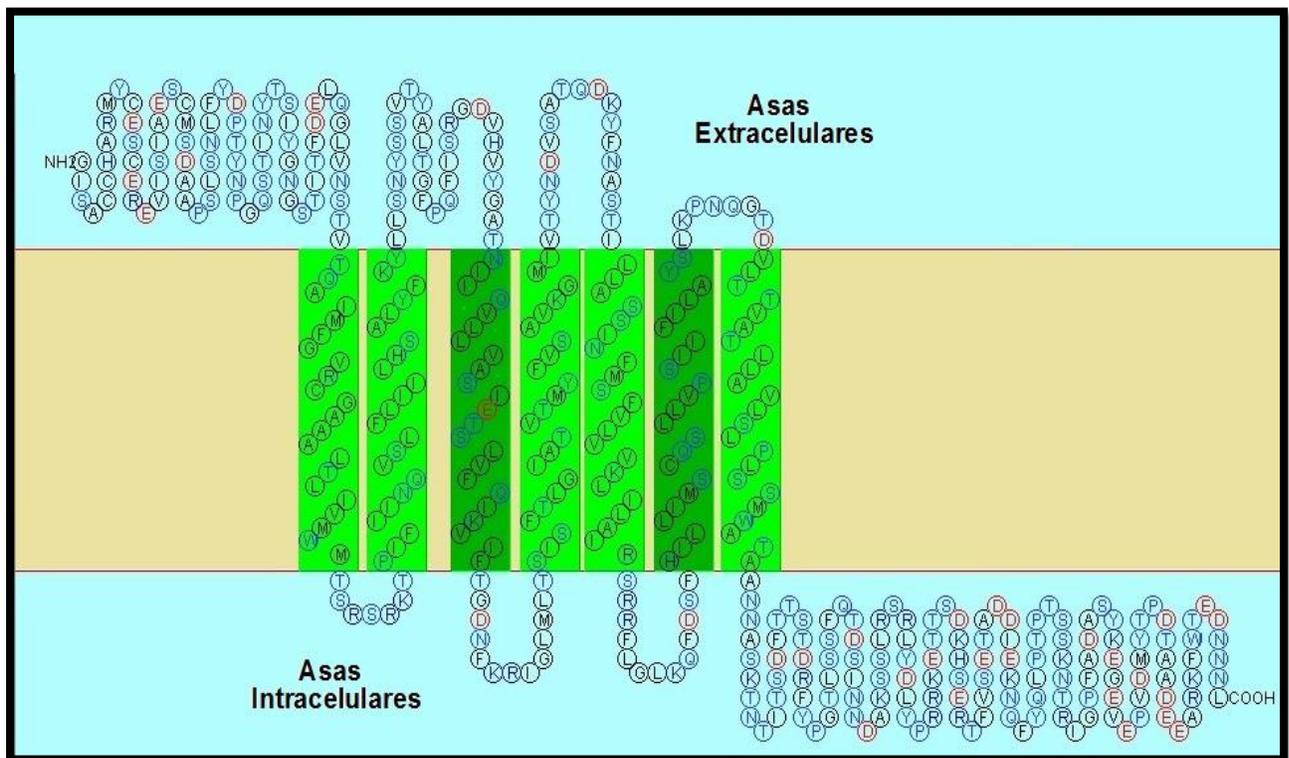


Fig. 5. Modelo basado en la estructura secundaria del receptor Ste2p de *S. cerevisiae* predicho por la herramienta SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>). Se pueden apreciar los siete dominios transmembranales característicos de los receptores GPCR, así como las asas intra y extracelulares.

La unión del ligando al receptor permite que este último pase de un estado inactivado (R) a un estado activado (R<sup>\*</sup>). La unión ligando-R<sup>\*</sup> forma un complejo ternario con la proteína G que permite el intercambio de GDP por GTP en el sitio de alta afinidad para nucleótidos de guanina localizado en la subunidad G $\alpha$ . Algunos modelos proponen que el receptor en estado inactivado puede asociarse a la proteína G en ausencia de ligando, conformando un complejo de pre-activación<sup>21, 22</sup>.

Diversos estudios sugieren que ciertos aminoácidos del receptor Ste2p de *S. cerevisiae* juegan papeles importantes durante la unión a la feromona y la subsecuente señalización. Tal es el caso del extremo carboxilo terminal, el cual, aunque no es necesario para la unión del ligando, sí está implicado en la desensibilización de la feromona, la inducción de la endocitosis del ligando y en la formación del complejo de pre-activación al mantener unido el receptor a la proteína G<sup>22, 23</sup>. Por otro lado, se ha descrito que mutaciones en el extremo amino terminal de Ste2p generan una deficiencia en el arresto del ciclo celular en G1 así como una disminución en el apareamiento de las células<sup>24</sup>.

Se sabe poco del receptor Ste2p de *C. glabrata*. Sin embargo, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los receptores de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* permite identificar que las diferencias más evidentes entre ellos se encuentran a partir de los residuos 298 y 291 de los receptores de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* respectivamente (figura 6). La región comprendida por estos residuos corresponde al extremo carboxilo terminal<sup>22</sup>.

La unión de la feromona y su receptor genera diversas respuestas biológicas: arresto en la fase G1 del ciclo celular para obtener sincronía para el apareamiento, generación de proyecciones celulares involucradas en el proceso de fusión, cambios en la estructura del citoesqueleto que llevan a la polarización de la célula, activación de gran número de genes necesarios para la conjugación sexual, entre otras<sup>17, 25</sup>.



proteínas cinasas Ste20p, Ste11p, Ste7p y Fus3p<sup>26</sup> (figura 7). La señalización persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP y las subunidades de la proteína heterotrimérica se reasocian, completando así el ciclo de activación<sup>25</sup>. Los principales componentes de la vía y su función se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Algunos de los componentes clave de la vía de señalización de feromona en levaduras

Proteína	Función
<b>Ste2p, Ste3p</b>	Receptor de siete dominios transmembranales unido a proteína G
<b>Gpa1p</b>	Subunidad $\alpha$ de la proteína G
<b>Ste4p, Ste18p</b>	Subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G
<b>Ste5p</b>	Proteína adaptadora que permite el anclaje de $G\beta\gamma$ , proteínas de la cascada MAPK y otros
<b>Bem1p</b>	Involucrada en el establecimiento de la polaridad, unión a Ste5p, Cdc24p, Cdc42p y Ste20p
<b>Cdc24p</b>	Factor de intercambio de guanina para Cdc42p
<b>Cdc42p</b>	Proteína G tipo rho, unión a Bem1p, Ste20p y otros
<b>Bni1p</b>	Componente del polarisoma. Orienta la formación de filamentos de actina
<b>Ste20p</b>	Proteína PAK, activada por Cdc42p
<b>Ste11p</b>	MEK cinasa, activada por Ste20p
<b>Ste50p</b>	Unión a la región N terminal de Ste11p, ayudándola a mantenerse activa
<b>Ste7p</b>	MEK cinasa, activada por Ste11p
<b>Kss1p, Fus3p</b>	MAP cinasas, activadas por Ste7p
<b>Msg5p</b>	Proteína fosfatasa encargada de defosforilar Fus3p
<b>Ste12p</b>	Sustrato de MAP cinasas, transactivador transcripcional de unión a DNA
<b>Dig1p, Dig2p</b>	Sustratos de MAP cinasas, represor de la actividad transcripcional de Ste12p
<b>Far1p</b>	Sustrato de MAP cinasas, inhibidor de la progresión del ciclo celular, proteína adaptadora unida a Cdc24p
<b>Fus1p</b>	Proteína localizada en la punta del <i>shmoo</i> . Requerida para la polarización y fusión celular

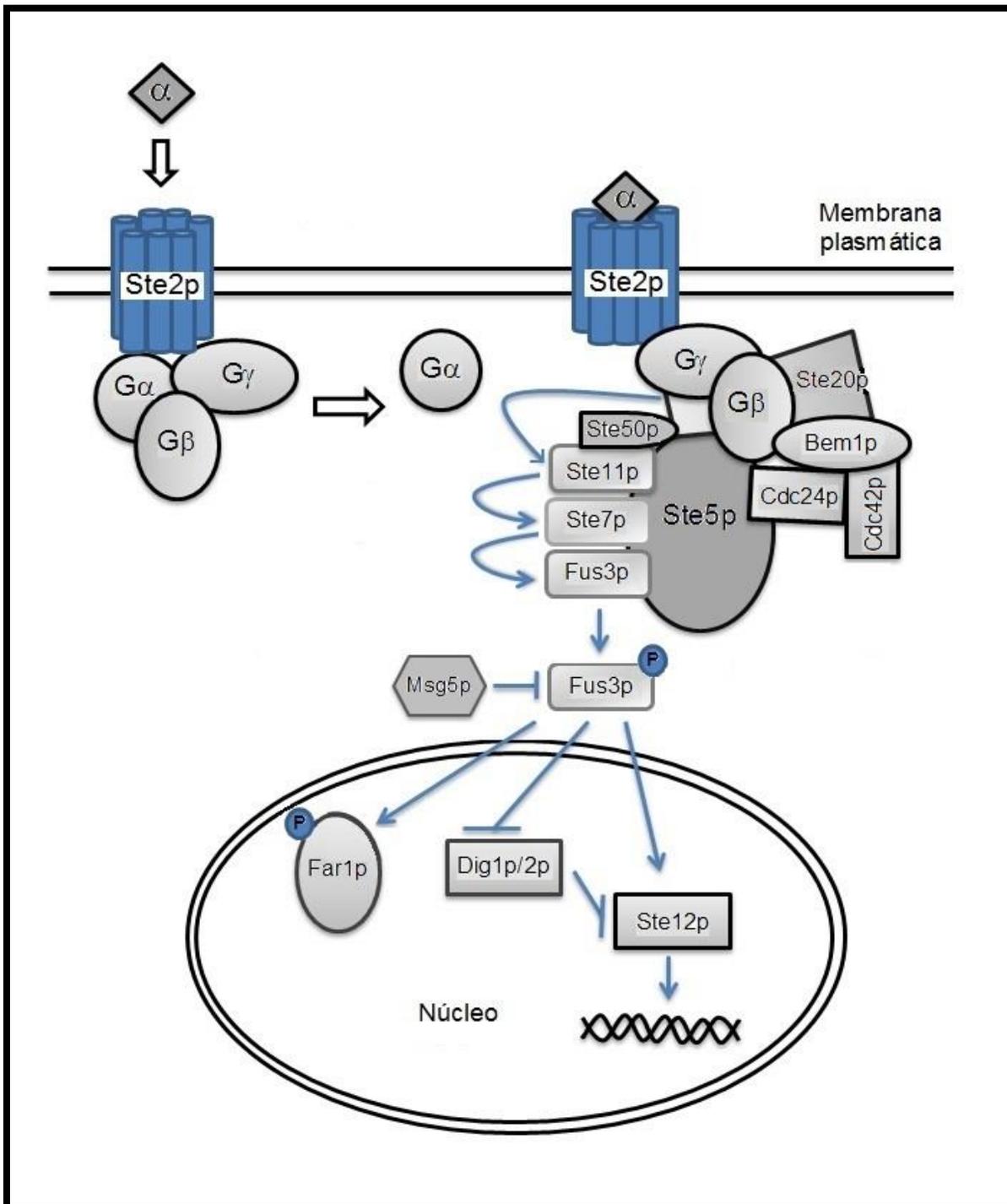


Fig. 7. Componentes de la vía de señalización de feromona en levaduras. La unión de la feromona a su receptor provoca la disociación de la proteína G heterotrimérica. La subunidad G $\beta\gamma$ , junto con diversas proteínas efectoras, transmite la señal hasta activar a las MAP quinasas (Ste11p, Ste7p, Fus3p). A su vez, la proteína Fus3p activada entra al núcleo para favorecer la activación de Ste12p y Far1p. Otros componentes adicionales modulan la señalización, incluidas las fosfatasa de MAP quinasas (Msg5p), el activador de Ste11p (Ste50p) y los inhibidores de Ste12p (Dig1p, Dig2p).

La subunidad  $G\beta\gamma$  transmite la señal al unirse a tres diferentes efectores: 1) el complejo Far1p/Cdc24p, 2) la proteína cinasa Ste20p y 3) el complejo Ste5p/Ste11p. La unión a estos efectores se debe a las interacciones de superficie entre ellos y Ste4p (subunidad  $G\beta$ ), mientras que Ste18p (subunidad  $G\gamma$ ) ancla el complejo  $G\beta\gamma$  a la membrana mediante uniones covalentes con grupos lipídicos<sup>27</sup>.

El primer efector es Cdc24p, un factor de intercambio de guanina para Cdc42p. Cdc24p se une fuertemente a Far1p, provocando su localización en la membrana plasmática donde Cdc42p se encuentra anclado. Una vez localizado, Cdc24p actúa sobre su sustrato promoviendo el cambio de GDP por GTP. La formación del complejo  $G\beta\gamma$ -Far1p-Cdc24p-Cdc42p es crucial para modular la polaridad y morfogénesis que ocurre durante el apareamiento celular<sup>27</sup>.

El segundo efector, Ste20p, es miembro de la familia de las proteínas cinasas activadas por p21 (PAK). Su activación se debe a la unión con Cdc42p, permitiendo la autofosforilación de Ste20p. Además, la unión de Ste20p con Bem1p facilita la localización de dicho complejo en la membrana, desencadenando la cascada de proteínas cinasas compuesta por Ste11p, Ste7p, Kss1p y Fus3p<sup>24</sup>.

La proteína de andamiaje Ste5p actúa como el tercer efector. Ste5p es una proteína multifuncional que no posee actividad catalítica pero sirve como punto de unión para otras proteínas de la vía, aumentando su interacción y la eficiencia de señalización. La principal función de Ste5p es actuar como conector al unirse a  $G\beta\gamma$  y la proteína cinasa Ste11p, acercando a esta última a la membrana plasmática<sup>16, 27</sup>.

La activación de la cascada de las proteínas cinasas MAPK contribuye a la regulación de diversas respuestas celulares. Fus3p y Kss1p, componentes finales de esta cadena, regulan la expresión de genes inducidos por la exposición a feromona al fosforilar los factores de transcripción Ste12p, Dig1p y Dig2p<sup>28-30</sup>.

Finalmente, se cree que  $G\alpha$  también transmite una señal a través de diversos efectores generando una desensibilización a la feromona, ya sea disminuyendo la actividad de la GTPasa o sacando a la célula de su estado de arresto en G1<sup>25</sup>.

### 2.3 Consecuencias de la señalización de feromona

Las células expuestas a feromona presentan una serie de respuestas biológicas que preparan a las células para su conjugación, no sólo alterando su fisiología sino también mediando la comunicación entre ellas. Las principales respuestas se describen a continuación.

#### 2.3.1 Arresto del ciclo celular

Uno de los efectos de la señalización de la feromona es el bloqueo del ciclo celular en la fase G1, un punto de control denominado *Start*. El arresto del ciclo en esta fase es crítico debido a que asegura que las células haploides que se van a aparear sean fisiológicamente compatibles<sup>31</sup>.

En ausencia de feromona, el paso a través de *Start* es catalizado por la proteína cinasa Cdc28p, cuya actividad requiere la asociación con una de las ciclinas G1 (Cln1p, Cln2p y Cln3p). Ya que los niveles de Cdc28p son invariables durante el ciclo celular, la cantidad de ciclinas es el factor limitante para la activación del complejo Cln1p/2p-Cdc28p en el punto *Start*<sup>32</sup>.

En respuesta a la feromona, la transcripción de los genes *CLN1* y *CLN2* así como la actividad del complejo Cln1p/2p-Cdc28p cinasa se ven reducidos. La unión de la feromona a su receptor lleva a la fosforilación y activación de la MAP cinasa Fus3p, la cual es la encargada de fosforilar el inhibidor Far1p. A su vez, la proteína Far1p se une al complejo Cln1p/2p-Cdc28p inhibiendo su actividad, llevando al arresto del ciclo celular en la fase G1<sup>33-35</sup> (figura 8).

Además de Fus3p y Far1p, Ste12p también participa en el arresto del ciclo celular ya que es un activador transcripcional que, a grandes concentraciones, es capaz de causar arresto en G1 incluso en ausencia de feromona <sup>31</sup>.

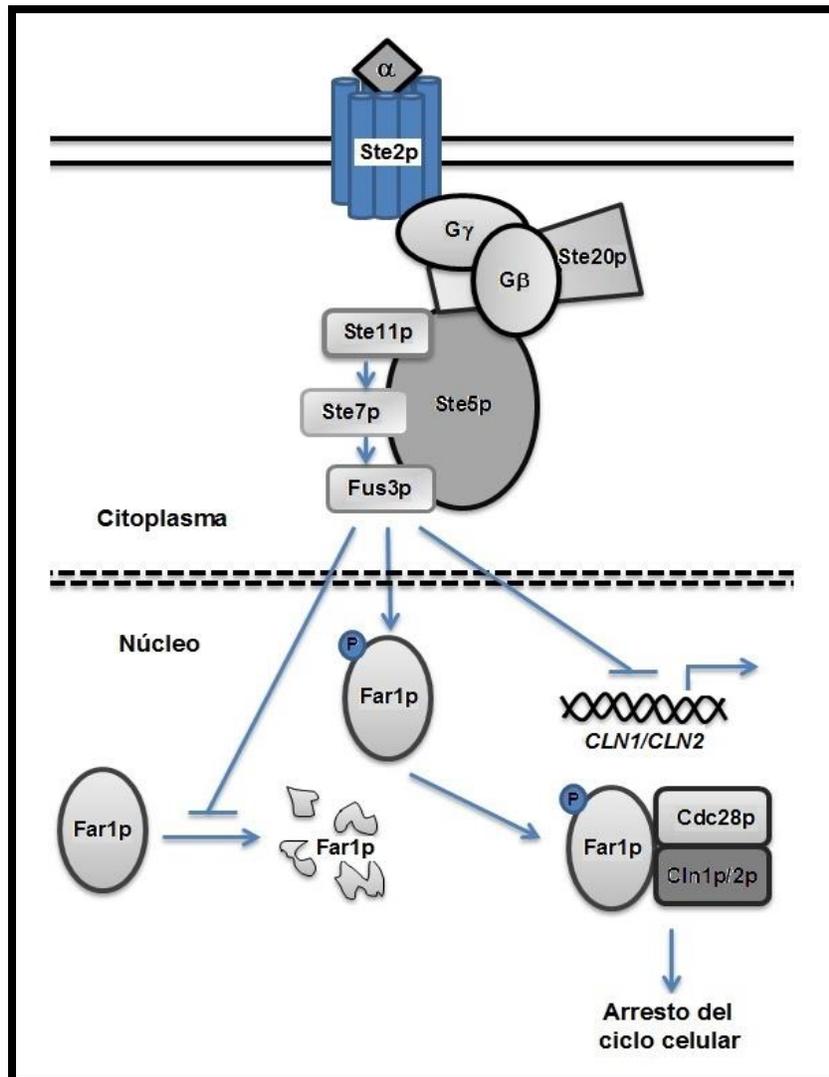


Fig. 8. Mecanismo implicado en el proceso de arresto celular mediado por feromona. Después de la activación de las MAP quinasas en respuesta a la feromona, Fus3p reprime la transcripción de las ciclinas G1 (*CLN1/CLN2*) además de facilitar la expresión y evitar la degradación del inhibidor Far1p. Far1p, tras ser fosforilado, se asocia al complejo Cln1p/2p-Cdc28p, inhibiendo su actividad.

### **2.3.2. Formación del fenotipo *shmoo***

Cuando las células son estimuladas por la feromona, éstas crecen de manera polarizada con el fin de facilitar el apareamiento creando elongaciones que siguen el gradiente de feromona hasta que las células entran en contacto. Las células que presentan éstas elongaciones son conocidas como *shmoo*. Después del contacto, se genera una unión estable entre el par de células de modo que la pared celular pueda ser degradada y las membranas plasmáticas puedan fusionarse<sup>36</sup>.

Para que la fusión de las células se lleve a cabo es necesaria la participación de muchas proteínas, entre ellas, Fus3p y Far1p son de gran importancia. Al ser fosforilada, Fus3p entra al núcleo y fosforila a dos reguladores negativos del factor de transcripción Ste12p conduciendo a la transcripción de los genes requeridos para la fusión celular. Además, Fus3p activa a la proteína Far1p la cual es importante para determinar el sitio donde se generará la polarización de la célula y para orientar las proyecciones *shmoo*<sup>37</sup>.

Las células pueden polarizarse y generar proyecciones como consecuencia de la presencia de feromona mediante dos vías, ambas necesarias para una respuesta correcta (figura 9). En la primera, la subunidad G $\beta\gamma$  de la proteína G interacciona con Far1p reclutando a Cdc24p, Cdc42p y Bem1p para establecer el sitio donde se generará el *shmoo*. En la segunda, Fus3p activado se asocia con Gpa1p para fosforilar Bni1p y localizarlo, junto con el polarisoma, en el sitio *shmoo*<sup>36, 38</sup>. En este último caso, se sabe que la sobreexpresión de Bni1p conduce a la presencia de *shmoos* anormales con múltiples proyecciones<sup>34</sup>.

Finalmente, la señalización de la feromona también genera respuestas a nivel transcripcional, activando o suprimiendo genes con el fin de favorecer la conjugación sexual<sup>27</sup>.

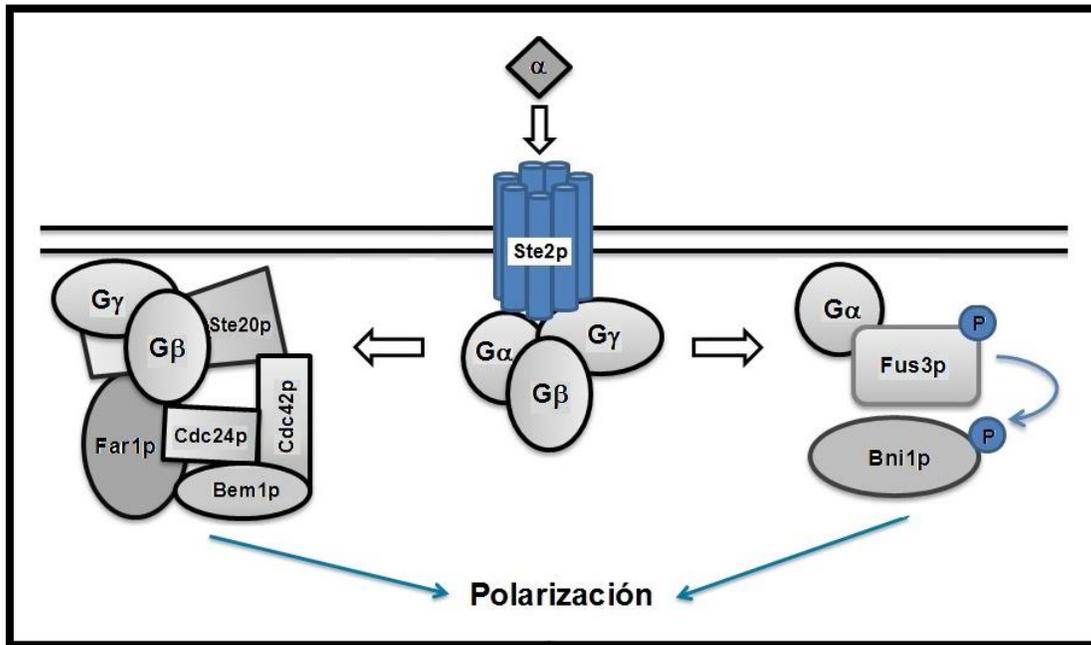


Fig. 9. Polarización celular y generación de *shmoo* inducidos por feromona. La unión de la feromona a su receptor provoca la disociación de la proteína G. La subunidad  $G\beta\gamma$  recluta a las proteínas Far1p, Cdc42p y Cdc24p para establecer el sitio del *shmoo*. Por otro lado, la subunidad  $G\alpha$  libre se une a Fus3p para fosforilar Bni1p y llevarla al sitio del *shmoo*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La feromona y su receptor son indispensables para la reproducción sexual de las levaduras ya que son los componentes iniciales de la vía de señalización que conduce al apareamiento. A pesar de que estos dos elementos presentan cierta similitud entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, aún no se ha reportado que *C. glabrata* sea capaz de llevar a cabo un ciclo sexual. Este hecho nos motivó a llevar a cabo el presente trabajo con el cual se pretende esclarecer cuál o cuáles de los componentes del mecanismo de señalización de la feromona  $\alpha$  en *C. glabrata* son los responsables de la señalización diferencial y, de este modo, contribuir al entendimiento de la capacidad reproductiva de esta levadura.

### 4. HIPÓTESIS

- La feromona  $\alpha$  y el receptor Ste2p de *C. glabrata* desempeñan una función distinta a la observada en *S. cerevisiae*, por lo tanto estos dos componentes, y no el resto de los implicados en la vía, son los responsables de que en *C. glabrata* no se observen las respuestas biológicas típicas generadas tras la activación de la vía de señalización de la feromona, incluyendo el apareamiento sexual.

## 5. OBJETIVOS

### 4.2.1 Objetivos generales

1. Evaluar la función del par feromona-receptor de *C. glabrata* y su implicación en la regulación del apareamiento sexual al expresar el receptor CgSte2p en células de *S. cerevisiae*.
2. Comparar las proteínas (así como sus genes codificantes) que forman parte de la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, y algunas otras levaduras, tanto sexuales como asexuales, con el fin de encontrar alguna diferencia marcada en *C. glabrata* que pueda estar asociada con la respuesta diferencial de dicha levadura a la feromona.

### 4.2.2 Objetivos particulares

- 1.1 Obtener el gen *CgSTE2* y clonarlo en un plásmido replicativo de *S. cerevisiae*.
- 1.2 Utilizar la construcción anterior para expresar de forma heteróloga el receptor CgSte2p en células de *S. cerevisiae*.
- 1.3 Evaluar la respuesta de estas células tras entrar en contacto con la feromona  $\alpha$ , tanto de *S. cerevisiae* como de *C. glabrata*.
- 2.1 Obtener las secuencias de cada uno de los genes y proteínas implicados en la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, y algunas otras levaduras de interés.
- 2.2 Comparar las proteínas de cada levadura (porcentajes de identidad y contenido de dominios) para identificar aquellas que difieren más con respecto a las de *S. cerevisiae*.

2.3 Identificar si los genes involucrados en la señalización de la feromona en *S. cerevisiae* se encuentran conservados en otras especies eucariotas con el fin de establecer su importancia para la reproducción sexual.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

## 6.1 Materiales

## 6.1.1 Especímenes biológicos

## 6.1.1.1 Bacterias

Cepa	Genotipo	Fuente
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10B	$\Delta$ ( <i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i> ) <i>mcrA recA1</i>	Gibco-BRL
XLI-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)].	Dr. Aguirre. IFC, UNAM

## 6.1.1.2 Levaduras

Cepa	Genotipo	Fuente
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
BY4741	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	GE Healthcare Dharmacon YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks <sup>39</sup>
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	GE Healthcare Dharmacon YKO MAT $\alpha$ Strain Collection-Glycerol Stocks <sup>39</sup>
YFL026W (BY4741 $\Delta$ <i>ste2</i> )	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 STE2::kanMX4</i>	GE Healthcare Dharmacon YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks <sup>39</sup>
<b><i>C. glabrata</i></b>		
CGM99	<i>Ura3D::Tn903(G418<sup>R</sup>), Trp 1D</i>	Domergue R. <sup>40</sup>

## 6.1.2 Enzimas

Nombre	Marca	Concentración comercial
NcoI	New England Biolabs	10 U/ $\mu$ L
XmaI	New England Biolabs	10 U/ $\mu$ L
XhoI	New England Biolabs	10 U/ $\mu$ L
Taq DNA polimerasa	New England Biolabs	5 U/ $\mu$ L
T4 DNA ligasa	New England Biolabs	400 U <sub>cohesivas</sub> / $\mu$ L
T4 DNA ligasa	Promega	100 U <sub>cohesivas</sub> / $\mu$ L
SuperScript III	Invitrogen	200 U/ $\mu$ L

## 6.1.3 Oligonucleótidos

Primer	Secuencia 5' $\rightarrow$ 3'	T <sub>m</sub>
<b>Amplificación de <i>CgSTE2</i></b>		
Fw:CgSTE2@1AAASma	cgcacccgggaaaatggagatgggctacgatc	58°C
Rv:CgSTE2+300Xho	gcgctcgagtcgtactaagggaacaaagg	60°C
<b>Amplificación de <i>ScSTE2</i></b>		
Fw:Ste2XbaI	Gggctagaatgtctgatgaggctcc	54°C
Rv:Ste2EcoRI	Ggggaattctcataaattattattcttcag	54°C
<b>Secuenciación de <i>CgSTE2</i></b>		
Up-pBC176+Cg	ttgctcattagaaagaaagc	54°C
pBC176-CgSTE2	ggttgctgcatagaagc	56°C
CgSTE2+pBC	attatctgattccaattgcc	54°C

## 6.1.4 Vectores de clonación

Vector	Resistencia/Auxotrofía	Fuente
pBC176 (CEN/ARS)	Ampicilina/Uracilo	Dra. Castaño. IPICYT
pGEM-T	Ampicilina	Promega

## 6.1.5 Péptidos

Nombre	Secuencia	Peso Molecular	Fuente
Feromona $\alpha$ <i>S. cerevisiae</i>	WHWLQLKPGQPMY	1684.0 g/mol	AnaSpec, EUA
Feromona $\alpha$ <i>C. glabrata</i>	WHWVRLRKGQGLF	1683.6 g/mol	AnaSpec, EUA

## 6.1.6 Soluciones comerciales

- Amortiguador *First-Strand 5X* para transcripción reversa (Invitrogen): 250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- Amortiguador *NEBuffer 4 10X* (New England Biolabs): 500 mM KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>; 200 mM Tris-Acetato; 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; 10 mM DTT
- Amortiguador *REBuffer 2 10X* (New England Biolabs): 500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT
- Amortiguador *Taq Reaction Buffer 10X* (New England Biolabs): 100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- Amortiguador *T4 DNA Ligase Reaction Buffer 10X* (New England Biolabs): 500 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM ATP; 100 mM DTT
- Amortiguador *Rapid Ligation Buffer 2X* (Kit Promega para pGEM-T): 60 mM Tris-HCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM DTT; 2 mM ATP; 10% PEG
- Coctel de RNAasa (Life Technologies)
- DNA de esperma de salmón 10mg/mL (Promega)
- dNTPs mix 100 mM (Invitrogen)
- Inhibidor de RNasa recombinante *RNaseOUT* 40 U/ $\mu$ L (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM (New England Biolabs)
- MgSO<sub>4</sub> 100 mM (New England Biolabs)

### 6.1.7 Equipo

Equipo	Marca
Incubadora 37°C	VWR
Incubadora 30°C SI-300R	Lab. Companion
Baño de agua Accu Block Dry Bath	Labnet International
Vortex Gene 2	Scientific Industries
Autoclave MLS-3780	Sanyo Electric
Mastercycler gradient	Eppendorf
Microcentrifuga 5415 R	Eppendorf
Avanti J-25 Centrifuge	Beckman coulter
Refrigerador 4°C	REVCO
Refrigerador -20°C	REVCO
Ultracongelador -70°C	REVCO
Spectro UV-Vis RS Spectrophotometer	LaboMed Inc.
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	ThermoScientific
High Performance Ultraviolet Transilluminator	UVP
Savant SpeedVac Concentrator	ThermoScientific

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Extracción de DNA genómico de *C. glabrata*

Se realizó una siembra de la cepa CGM99 de *C. glabrata* en medio YPD sólido (anexo A) y se incubó a 30°C por 48 horas. Una vez obtenidas las colonias, se tomó una de ellas y se inoculó en 5 mL de medio YPD líquido, los cuales se incubaron a 30°C con agitación constante durante 24 horas. Posteriormente, el medio se transfirió a tubos de plástico y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 500 µL de amortiguador de extracción A, cuya preparación

está descrita en el anexo A. Se siguió el protocolo correspondiente para la extracción del DNA genómico (Anexo C1).

### 6.2.2 Amplificación del gen *CgSTE2* de *C. glabrata*

Se realizó una dilución 1:10 del DNA obtenido en la sección anterior y se utilizó para llevar a cabo la amplificación del gen *CgSTE2* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos usados para la amplificación se muestran en la tabla 6.1.3 y fueron diseñados para flanquear el gen con los sitios de restricción de las enzimas *Xma*I y *Xho*I y facilitar su posterior clonación en el plásmido replicativo de *S. cerevisiae* pBC176. Los reactivos utilizados, tanto para las muestras de reacción como para el control de reactivos (control negativo), se señalan en la siguiente tabla.

Reactivo	Control (-)	Muestras
Agua estéril	40.0 $\mu$ L	38 $\mu$ L
Amortiguador <i>Taq Reaction</i> (10X)	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.0 $\mu$ L	2.0 $\mu$ L
dNTP's (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
DNA (1:10)	----	1.0 $\mu$ L
Oligonucleótido Fw (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L
Oligonucleótido Rv (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L
Taq DNA polimerasa	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L

El programa de PCR empleado durante la reacción fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	94° C, 5 min
Amplificación (30 ciclos)	94° C, 45 seg (desnaturalización) 57° C, 45 seg (alineamiento) 75° C, 2 min (extensión)
Extensión final	75° C, 7 min

Una vez terminada la reacción, las muestras se purificaron según el protocolo correspondiente del kit *QIAquick PCR Purification* (Anexo C3). Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% para saber si la amplificación se realizó correctamente. Se esperaba un producto de PCR de 1554 pb.

### 6.2.3 Clonación de *CgSTE2* en un vector intermedio

Antes de clonar *CgSTE2* en el vector replicativo de *S. cerevisiae* pBC176, el gen se subclonó en un vector intermedio que facilitaría su posterior corte con las enzimas de restricción correspondientes. El vector intermedio seleccionado fue pGEM-T (figura10), el cual está linealizado y posee terminales de timina que permiten aprovechar las terminales de adenina presentes en el producto de PCR, facilitando de esta forma la ligación<sup>41</sup>.

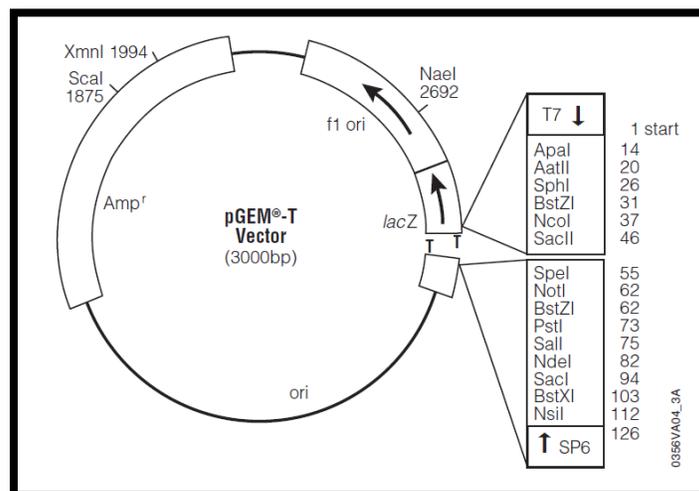


Fig.10. Mapa del vector pGEM-T. En él se observan los promotores T7 y SP6 (los cuales flanquean las regiones de clonación múltiple o *polylinker*), el casete de resistencia a ampicilina y el operón *lac*<sup>40</sup>.

La ligación se realizó empleando uno de los productos de PCR obtenidos anteriormente, cuya concentración fue de 76.8 ng/ $\mu\text{L}$ . La cantidad de DNA requerida para la ligación se calculó según la siguiente fórmula, tomando en cuenta que el vector

pGEM-T posee una concentración de 50 ng/μL y que el protocolo de ligación para este vector recomienda usar 50 ng del mismo<sup>41</sup>.

$$\left( \frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \right) \times (\text{relación inserto:vector}) = \text{ng inserto}$$

Para llevar a cabo la reacción de ligación se consideró una relación inserto: vector de 3:1 según las recomendaciones para el uso del vector<sup>41</sup>. Los componentes utilizados para la reacción son los siguientes:

Reactivo	Control (-)	Muestra
Amortiguador <i>Rapid Ligation</i> (2X)	5.0 μL	5.0 μL
pGEM-T	1.0 μL	1.0 μL
PCR	-----	1.0 μL
T4 DNA ligasa	1.0 μL	1.0 μL
Agua estéril	3.0 μL	2.0 μL

Las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron a 4°C durante 16 horas para aumentar la eficiencia de ligación.

El siguiente paso consistió en la transformación de las células competentes de *E. coli* XLI-blue con el producto de ligación anterior, empleando el protocolo descrito en el anexo C5. Las muestras resultantes de la transformación se plaquearon en cajas con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las cantidades de cada reactivo empleadas para llevar a cabo la transformación se muestran a continuación. Como control positivo de la transformación se empleó el DNA del plásmido pBC176 a una concentración de 200 ng/mL.

Reactivo	Control (+)	Control (-)	Muestra
DNA/Producto de ligación	2.0 $\mu$ L	-----	2.0 $\mu$ L
Agua estéril	-----	2.0 $\mu$ L	-----
Células XLI-blue	100.0 $\mu$ L	100.0 $\mu$ L	100.0 $\mu$ L
Amortiguador KCM	98.0 $\mu$ L	98.0 $\mu$ L	98.0 $\mu$ L
Medio SOC líquido	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L

Una vez que las células de *E. coli* crecieron, se llevó a cabo la comprobación de la ligación del vector pGEM-T con *CgSTE2* y de la posterior transformación con la ayuda de tres pruebas: 1) selección de recombinantes por la evaluación de colonias azules/blancas inducidas por IPTG/X-Gal, 2) PCR de colonia para comprobar la presencia del inserto y 3) ensayo de enzimas de restricción para comprobar que el inserto se ligó al vector en el sitio correcto.

La selección de colonias azules/blancas fue posible ya que el vector pGEM-T posee el operón lac. Las células transformantes que han captado el vector con el operón lac intacto pueden expresar activamente  $\beta$ -galactosidasa después de ser inducidas por IPTG. La  $\beta$ -galactosidasa hidroliza X-Gal, generando colonias azules. Por el contrario, las colonias de células transformantes que han introducido el inserto adecuadamente interrumpen el operon lac. En consecuencia, estas células poseen un gen *lacZ* inactivo que no permite expresar  $\beta$ -galactosidasa ni degradar X-Gal, por lo que sus colonias son de color blanco<sup>42</sup>. En este caso, después de la transformación se obtuvieron diez colonias blancas de las cuales se seleccionaron las más grandes para realizar las pruebas del ensayo enzimático y de la reacción de PCR de colonia.

Con un asa bacteriológica se tomó la mitad de estas colonias y se resuspendieron en 50  $\mu$ L de amortiguador de lisis para bacterias (anexo A). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 95°C y posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 4  $\mu$ L del sobrenadante y se emplearon como DNA templado para

realizar la reacción de PCR, la cual utilizó los oligonucleótidos, las cantidades de reactivos y el programa de PCR diseñados para amplificar el gen *CgSTE2* antes mencionados. Terminada la reacción, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se utilizaron para llevar a cabo la comprobación de las bandas por electroforesis en un gel de agarosa 1%.

Por otra parte, se tomó la otra mitad de las colonias seleccionadas, se inocularon en tubos de vidrio con medio LB líquido y ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubaron a 37°C con agitación constante durante 12 horas. Después de este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 3.5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón resultante se resuspendió para realizar la purificación de la muestra según el protocolo del kit *QIAprep Spin Miniprep* (anexo C3).

A partir de las muestras purificadas se realizó un ensayo enzimático empleando la enzima *NcoI*, la cual posee dos sitios de restricción en la construcción *pGEM-T/CgSTE2* según lo esquematizado en la imagen de la figura 11. Al digerir el DNA con esta enzima se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 1450 pb y otro de 3090 pb aproximadamente. La digestión de las muestras se realizó según la siguiente tabla, durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra para llevar a cabo la comprobación de las bandas mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%.

Reactivo	Muestra
Amortiguador <i>REBuffer 2</i> (10X)	2.0 $\mu\text{L}$
DNA purificado	6.0 $\mu\text{L}$
<i>NcoI</i>	0.8 $\mu\text{L}$
Agua estéril	12.0 $\mu\text{L}$

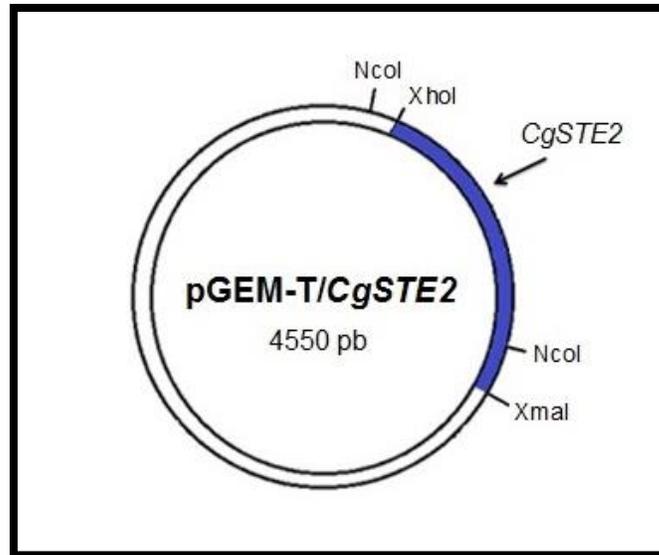


Fig. 11. Mapa de restricción creado para la construcción pGEM-T/CgSTE2 donde se muestra el sitio de corte de las enzimas NcoI, XhoI y XmaI utilizadas durante este trabajo.

Para contar con un respaldo de células transformantes que contengan la construcción pGEM-T/CgSTE2, se realizó una nueva transformación de las células *E. coli* XLI-blue empleando el DNA obtenido de los dos minipreps generados en el punto anterior. De esta nueva transformación, se seleccionaron doce colonias para ser usadas en los experimentos posteriores. Estas colonias se purificaron mediante el kit *QIAprep Spin Miniprep* y se cuantificaron empleando un espectrofotómetro Nanodrop. Las concentraciones obtenidas para cada muestra purificada son las siguientes:

Muestra	Concentración (ng/μL)	Muestra	Concentración (ng/μL)
1	146.1	7	144.2
2	165.6	8	156.0
3	182.3	9	173.7
4	143.6	10	163.1
5	175.8	11	170.1
6	157.5	12	155.1

### 6.2.4 Generación de la construcción pBC176/CgSTE2

Para obtener la construcción pBC176/CgSTE2 que será expresada en *S. cerevisiae*, fue necesario seguir tres pasos: 1) recuperar el gen *CgSTE2* del vector pGEM-T, 2) purificar y digerir el plásmido pBC176 y 3) clonar *CgSTE2* en pBC176.

#### 6.2.4.1 Recuperación de *CgSTE2*

A partir de las doce muestras purificadas y cuantificadas según lo señalado en la sección anterior, se realizó una doble digestión empleando las enzimas XmaI y XhoI para generar los extremos necesarios para la ligación del gen con pBC176. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 3.5 horas empleando las cantidades señaladas en la siguiente tabla.

Reactivo	Muestras					
	1	2	3	4	5	6
Amortiguador <i>NEBuffer 4 (10X)</i>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
DNA	10.3 µL	9.1 µL	8.3 µL	10.5 µL	8,7 µL	9,3 µL
Xma I	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Xho I	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
BSA	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Agua estéril	6.5 µL	7.7 µL	8.5 µL	6.3 µL	8.1 µL	7.5 µL
Reactivo	Muestra					
	7	8	9	10	11	12
Amortiguador <i>NEBuffer 4 (10X)</i>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
DNA	10.4 µL	9.6 µL	8.6 µL	9.2 µL	8.8 µL	9.7 µL
XmaI	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
XhoI	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
BSA	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Agua estéril	6.4 µL	7.2 µL	8.2 µL	7.6 µL	8.0 µL	7.1 µL

Después de la digestión, el volumen total de las muestras se tomó para realizar una electroforesis en gel de agarosa 1%, esperándose obtener bandas de aproximadamente 3000 pb y 1550 pb correspondientes al vector pGEM-T y al gen *CgSTE2* respectivamente. Esta última banda se cortó del gel con ayuda de una espátula y se purificó con el kit *QIAquick Gel Extraction* siguiendo las indicaciones del protocolo correspondiente (anexo C4).

Una vez purificadas, las muestras se agruparon de tres en tres para generar un total de cuatro muestras. Estas se colocaron en un equipo Savant Concentrator para reducir el volumen final hasta 50  $\mu\text{L}$  con el propósito de aumentar las concentraciones de *CgSTE2* extraído de la construcción con el vector.

Las concentraciones obtenidas se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu\text{L}$ )
1	12.1
2	23.0
3	31.5
4	23.2

### 6.2.4.2 Purificación y digestión del vector pBC176

El plásmido escogido para clonar el gen *CgSTE2* fue el plásmido replicativo pBC176, cuyo mapa se muestra en la figura 12. pBC176 tiene el esqueleto del vector replicativo pRS416 (CEN/ARS, marcador de selección *URA3+*) más el promotor del gen *TEF1* de *S. cerevisiae* con el fin de dirigir la expresión de *CgSTE2*<sup>43,44</sup>.

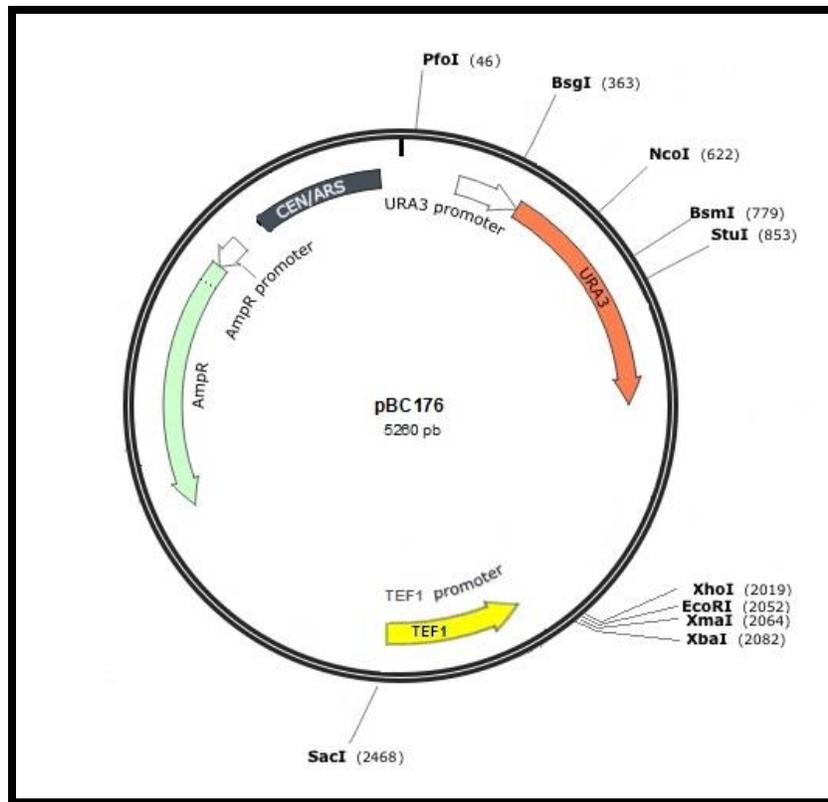


Fig. 12. Mapa del vector pBC176. Al poseer el esqueleto del vector pRS416, pBC176 tiene el marcador de uracilo y el casete de ampicilina como marcadores de selección. El promotor *TEF1* se insertó con el fin de dirigir la expresión de *CgSTE2*.

Este plásmido se encuentra expresado en la cepa DH10B de *E. coli* por lo que, para poder extraerlo y purificarlo, fue necesario inocular colonias de esta cepa en medio LB/ampicilina líquido e incubar durante 12 horas a 37°C con agitación constante. A partir de este cultivo se llevó a cabo la purificación del plásmido siguiendo el protocolo del kit de purificación *QIAprep Spin Miniprep QIAGEN* (anexo C2). Una vez obtenido el plásmido puro, este se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm obteniéndose una concentración de 2070 ng/mL.

Para generar los extremos cohesivos que permitirían la ligación del plásmido con el gen *CgSTE2*, fue necesario digerir el plásmido purificado con las enzimas de restricción *XmaI* y *XhoI*. Se prepararon dos muestras de reacción a partir de una dilución 1:10 del

plásmido (concentración final 200 ng/mL), utilizando los reactivos y las cantidades señalados en la siguiente tabla. La digestión se realizó durante 3.5 horas a 37°C.

Reactivo	Muestra
Amortiguador <i>NEBuffer 4</i> (10X)	5 $\mu$ L
DNA	7.5 $\mu$ L
Xmal	1.5 $\mu$ L
XhoI	1.5 $\mu$ L
BSA	0.2 $\mu$ L
Agua estéril	34.5 $\mu$ L

Al finalizar la reacción, las muestras se incubaron 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima y posteriormente se purificaron según lo especificado en el protocolo del kit *QIAquick Gel Extraction*. Las muestras se cuantificaron obteniéndose una concentración de 70.2 ng/ $\mu$ L y 75.3 ng/ $\mu$ L.

#### 6.2.4.3 Clonación de *CgSTE2* en el plásmido pBC176

El siguiente paso consistió en la ligación del plásmido pBC176 y el gen *CgSTE2*. Se llevaron a cabo cuatro reacciones de ligación (una por cada muestra obtenida de *CgSTE2*) más un control negativo, según lo señalado en la siguiente tabla. La cantidad de *CgSTE2* empleada para cada muestra de reacción se calculó con ayuda de la misma fórmula utilizada para el vector pGEM-T mencionada anteriormente y considerando una relación inserto:vector de 3:1 para las muestras 1 y 2, y una relación 5:1 para las muestras 3 y 4. Las muestras se incubaron a 16°C por aproximadamente 14 horas.

Reactivo	Muestra				
	Control (-)	1	2	3	4
Amortiguador <i>T4 DNA Ligase</i> (10X)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
pBC176	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<i>CgSTE2</i>	-----	10 $\mu$ L	5.5 $\mu$ L	6.5 $\mu$ L	9 $\mu$ L
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua estéril	15 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9.5 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L	6 $\mu$ L

Finalmente, la construcción pBC176/*CgSTE2* se transformó en las células competentes *E. coli* XLI-blue siguiendo el protocolo detallado en el anexo C5. La siguiente tabla muestra las cantidades empleadas para las transformaciones. El control positivo consistió en una muestra del plásmido pBC176 sin digerir a una concentración de 200 ng/mL.

Reactivo	Control (+)	Control (-)	Muestras 1-4
DNA/Producto de ligación	2.0 $\mu$ L	-----	2.0 $\mu$ L
Agua estéril	-----	2.0 $\mu$ L	-----
Células XLI-blue	100.0 $\mu$ L	100.0 $\mu$ L	100.0 $\mu$ L
Amortiguador KCM	98.0 $\mu$ L	98.0 $\mu$ L	98.0 $\mu$ L
Medio SOC líquido	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L

Las células de la mezcla de transformación se plaquearon en cajas con medio LB con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/mL y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una vez que se obtuvieron colonias de células transformantes, se procedió a comprobar que la ligación del vector pBC176 con el inserto *CgSTE2* se realizó de forma correcta. Para ello, se siguieron tres estrategias: 1) ensayo de enzimas de restricción, 2) PCR para comprobar la presencia del inserto y 3) secuenciación.

Se obtuvieron un total de once colonias, las cuales se tomaron con un asa bacteriológica y se inocularon en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante durante 12 horas. Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 3.5 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió para purificar la muestra de acuerdo a lo señalado en el protocolo del kit *QIAprep Spin Miniprep QIAGEN* (anexo C2).

A partir de estas muestras purificadas, se realizó el ensayo con las enzimas XmaI y XhoI, las cuales permitieron digerir la construcción pBC176/CgSTE2 para generar dos fragmentos de aproximadamente 5600 pb y 1550 pb, los cuales corresponden al vector pBC176 y al gen CgSTE2 respectivamente. Las cantidades usadas de cada reactivo para las muestras de digestiones se muestran a continuación.

Reactivo	Muestra
Amortiguador NEBuffer 4 (10X)	2 $\mu$ L
DNA	6 $\mu$ L
XmaI	0.8 $\mu$ L
XhoI	0.8 $\mu$ L
BSA	0.1 $\mu$ L
Agua estéril	10.4 $\mu$ L

Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 horas. Al terminar de la reacción, se tomaron 5  $\mu$ L de muestra para realizar una electroforesis en gel de agarosa 1% para buscar las bandas de los tamaños esperados.

Además del ensayo enzimático, las muestras purificadas por Miniprep se emplearon como DNA templado para realizar una reacción de PCR, la cual permitió confirmar la inserción de CgSTE2 en pBC176. La reacción se llevó a cabo siguiendo el programa de PCR diseñado para la amplificación del gen CgSTE2 (sección 6.2.2). Se tomaron 5  $\mu$ L

del producto de PCR resultante y se usaron para una electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se esperaba observar la banda correspondiente al gen de interés.

La muestra que dio resultados positivos en ambas pruebas se usó para una nueva transformación de las células de *E. coli* XLI-blue, con el fin de contar con un respaldo de células transformantes que contengan la construcción deseada. Las colonias resultantes de esta nueva transformación se procesaron con ayuda del kit *QIAprep Spin Miniprep QIAGEN* y se cuantificaron.

La secuenciación del gen *CgSTE2* clonado en el vector pBC176 se llevó a cabo a partir de una de las muestras Miniprep obtenidas de la última transformación. Para ello, se diseñaron tres oligonucleótidos que abarcaran la secuencia completa del gen (sección 6.1.5). La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

### **6.2.5 Expresión del receptor Ste2p de *C. glabrata* en *S. cerevisiae***

Una vez obtenida la construcción pBC176/*CgSTE2*, esta se empleó para transformar una cepa de *S. cerevisiae* que posee una delección de gen *STE2*. Para ello, se realizó una siembra de la cepa  $\Delta ste2$  de *S. cerevisiae* (YFL026W) en medio YPD líquido y se incubó a 30°C por 24 horas. La transformación se realizó por duplicado según el protocolo correspondiente (anexo C6) empleando una muestra del vector pBC176/*CgSTE2* con una concentración de 400.1 ng/ $\mu$ L. Las células se plaquearon en cajas con medio mínimo SD-ura y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Las colonias resultantes de la transformación se resembraron en cajas con el mismo medio para contar con suficientes colonias para los experimentos posteriores.

Una vez obtenidas las colonias de células transformantes, el siguiente paso consistió en medir la expresión del gen *CgSTE2*. En este caso, se realizó una medición relativa evaluando el cambio en los niveles de expresión del RNA mensajero (mRNA) entre las células que contienen el gen de *C. glabrata* y una cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

Para llevar a cabo la medición fue necesario extraer el RNA total de las células. Con ese fin, las colonias transformantes obtenidas en el paso anterior se inocularon en 5 mL de medio mínimo SD-ura líquido y se incubaron a 30°C durante 8 horas. A la par, se realizó un cultivo de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* (cepa silvestre) en medio mínimo SD líquido. Pasado este tiempo, se tomaron 200 mL de cada cultivo y se diluyeron en el medio de cultivo correspondiente, a fin de obtener una D.O.<sub>600</sub> de 0.05. Estos cultivos diluidos se incubaron durante toda la noche a 30°C con agitación constante. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O.<sub>600</sub> de entre 0.5 a 0.8, se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron y procesaron de acuerdo al protocolo correspondiente descrito en el anexo C7.

La cantidad de RNA obtenida fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con formaldehído, cuyo protocolo se encuentra en el anexo C8. El RNA se cuantificó, obteniéndose concentraciones de 2.30 µg/µL para la cepa silvestre y 2.38 µg/µL para las células transformantes.

Las muestras de RNA obtenidas se utilizaron para llevar a cabo una transcripción reversa mediante la enzima SuperScript III (anexo C9), seguida de una reacción de PCR para amplificar el DNA complementario (cDNA) generado en la reacción anterior. En el caso del cDNA obtenido a partir de las células transformantes que poseen el gen *CgSTE2*, la última reacción de PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos y el programa diseñado para amplificar *CgSTE2*. El cDNA obtenido de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* se amplificó empleando el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ScSTE2* (sección 6.1.3) y mediante el siguiente programa de PCR.

Desnaturalización inicial	94° C, 5 min
Amplificación (30 ciclos)	94° C, 45 seg (desnaturalización) 51° C, 45 seg (alineamiento) 75° C, 1.5 min (extensión)
Extensión final	75° C, 7 min

Al finalizar la reacción, se tomaron 5  $\mu$ L de cada muestra para realizar una electroforesis en gel de agarosa 1% y observar los cDNAs correspondientes.

### 6.2.6 Ensayos con la feromona $\alpha$ de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*

La feromona  $\alpha$ , tanto de *S. cerevisiae* como de *C. glabrata*, se mandaron sintetizar a la compañía AnaSpec (<http://www.anaspec.com/>) ubicada en California, EUA. Al estimular las células transformantes que están expresando el receptor CgSte2p con estas feromonas, se esperaba observar tres respuestas típicas: 1) arresto del ciclo celular, 2) formación del fenotipo *shmoo* y 3) apareamiento celular.

#### 6.2.6.1 Arresto del ciclo celular

Para realizar la prueba, se generaron cultivos de las cepas transformantes obtenidas en los pasos anteriores en 10 mL de medio mínimo SD-ura líquido. De igual modo, se inocularon colonias de las cepas silvestre y  $\Delta ste2$  de *S. cerevisiae* Mata y de la cepa silvestre de *C. glabrata* Mata en 10 mL de medio mínimo SD. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 30°C y con agitación constante. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias de cada cultivo para obtener una D.O.<sub>600</sub> entre 0.11 y 0.12.

La cantidad de feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* requerida para generar arresto en las células de la cepa silvestre de la propia *S. cerevisiae* ya se había evaluado en un trabajo previo realizado por este laboratorio<sup>45</sup>. Basándose en esto, se decidió utilizar una concentración de feromona  $\alpha$  de 15  $\mu$ M (partiendo de una solución madre de 462 $\mu$ M). Las muestras para evaluar la respuesta a esta feromona se prepararon según la siguiente tabla. El medio SD estéril utilizado dependió de la cepa a evaluar.

Componentes	Volumen
Cultivo celular	37.5 $\mu$ L
Medio SD estéril	107.5 $\mu$ L
Feromona $\alpha$ <i>S. cerevisiae</i> (462 $\mu$ M)	5.0 $\mu$ L

En el caso de la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*, no se contaba con un estudio previo que estandarice la concentración de feromona necesaria para observar el arresto celular. Por lo tanto, se decidió evaluar cinco concentraciones distintas de feromona: 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, partiendo de una solución madre con una concentración de 352  $\mu$ M. Las muestras de reacción para la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* se muestran en la siguiente tabla.

Componentes	2 $\mu$ M	10 $\mu$ M	15 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Cultivo celular	37.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L
Medio SD estéril	111.5 $\mu$ L	108.2 $\mu$ L	106.1 $\mu$ L	104.0 $\mu$ L	91.2 $\mu$ L
Feromona $\alpha$ <i>C. glabrata</i> (352 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L	4.3 $\mu$ L	6.4 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L	21.3 $\mu$ L

Las muestras se colocaron en una placa de media área de 96 pozos y se midieron en un multilector de placas *Synergy* que determina el crecimiento celular a partir de la densidad óptica. La cinética consistió en cuatro mediciones durante los primeros dos minutos (promediado como tiempo cero) más una medición cada hora durante 24 horas a una longitud de onda de 600 nm.

#### 6.2.6.2 Formación del fenotipo *shmoo*

Se generaron cultivos de la cepa transformante que está expresando el receptor CgSte2p y de las cepas silvestre y  $\Delta$ ste2 de *S. cerevisiae* en 10 mL de medio mínimo

SD-ura y SD completo respectivamente y se incubaron 24 horas a 30°C con agitación constante. Pasado este tiempo, se realizaron las diluciones necesarias de cada cultivo para obtener una D.O.<sub>600</sub> de 0.4. Se tomaron 200 µL de cultivo y se les añadió feromona  $\alpha$  (tanto de *S. cerevisiae* como de *C. glabrata* de forma independiente) a una concentración de 15 µM. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 30°C con agitación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se retiró con ayuda de una pipeta y el botón se resuspendió en 20 µL de medio. Se tomaron 10 µL de esta muestra y se observaron al microscopio en busca de las elongaciones características del fenotipo *shmoo*. La búsqueda se realizó en al menos 200 células.

### 6.2.6.3 Capacidad de apareamiento entre células haploides

Para probar la capacidad de las células transformantes de *S. cerevisiae* que están expresando el receptor CgSte2p (*Mata*) de aparearse con las células del tipo celular contrario (*Mata*), se realizó un ensayo de complementación mediante el estriado de ambas células en cajas con medio mínimo SD-lys-met-ura. Este medio de selección se escogió debido a que, en caso de apareamiento, las auxotrofías de cada tipo celular se complementarían permitiendo el crecimiento de las células diploides, incluyendo aquellas que posean el plásmido donde se clonó el receptor (marcador *URA3+*). El control positivo del experimento consistió en el apareamiento de las cepas *Mata* y *Mata* silvestres en medio mínimo SD-lys-met.

El experimento consistió en estriar, de forma horizontal, colonias de la cepa BY4742 de *S. cerevisiae* (*Mata* silvestre) en cajas con el medio de selección. Sobre estas estrías, se realizó el estriado de las colonias de la cepa transformante en sentido perpendicular a las estrías existentes, tal como se muestra en la figura 13. A su vez, se realizó el estriado independiente de cada cepa como control negativo del experimento. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30 °C.

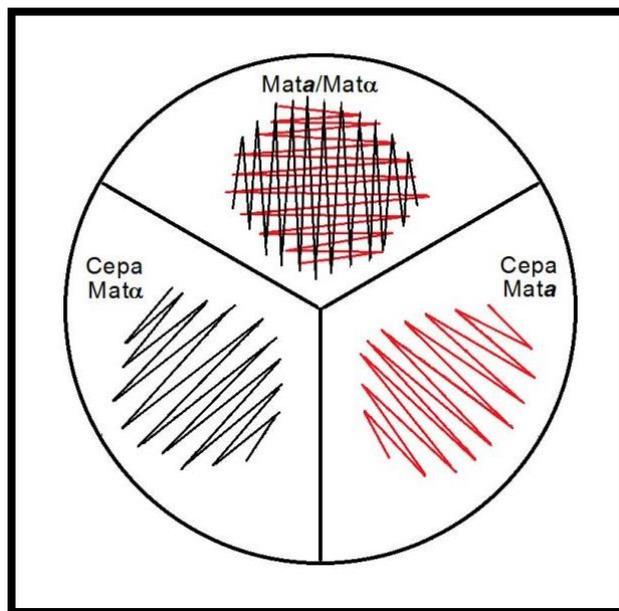


Fig. 13. Esquema del estriado de colonias para la prueba de apareamiento. Las cajas se dividieron en tres secciones, una para la cepa  $Mat\alpha$ , otra para la cepa  $Mata$  y la tercera para la intersección de ambas ( $Mata/Mat\alpha$ ). En esta última sección, las colonias de la cepa  $Mata$  se estriaron en sentido horizontal mientras que la cepa  $Mat\alpha$  se estrió verticalmente. Este esquema se siguió para las muestras control, así como para los ensayos de apareamiento para ambas feromonas.

Las células transformantes secretarán la feromona  $a$ , la cual será reconocida por el receptor específico ubicado en las células  $Mat\alpha$ . A su vez, éstas secretarán feromona  $\alpha$  que deberá ser reconocida por el receptor  $CgSte2p$  presente en las células transformantes, activando la vía de señalización de la feromona y, finalmente, promoviendo el apareamiento de las células.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* para inducir el apareamiento de las células que expresan el receptor  $Cgste2p$ . Para ello, se realizó un cultivo de estas células en medio SD-ura líquido a las que se les añadió la feromona de *C. glabrata* a una concentración de 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M. Los cultivos se incubaron durante 2 horas y, posteriormente, se utilizaron para realizar el estriado sobre las colonias de la cepa  $Mat\alpha$  silvestre. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30 °C. Al

igual que en el ensayo anterior, se espera que ambos tipos celulares puedan aparearse y generar un diploide que crezca en el medio de selección.

La siguiente tabla resume el ensayo realizado para evaluar el apareamiento de las células haploides de *S. cerevisiae* inducido por el par feromona-receptor de *C. glabrata*.

	Cepas				
	Mata $\alpha$	Mata	Mata*	Mata/Mata $\alpha$	Mata*/Mata $\alpha$
<b>Auxotrofías</b>	-lys -ura	-met -ura	-met	----	----
<b>Complementación</b>	----	----	----	+lys +met -ura	+lys +met +ura
<b>Crecimiento en medio SD-lys-met</b>	No	No	No	Sí	Sí
<b>Crecimiento en medio SD-lys-met-ura</b>	No	No	No	No	Sí

La cepa Mata\* corresponden a las células Mata  $\Delta$ ste2 que están expresando el receptor Cgste2p y, por lo tanto, contienen el plásmido pBC176 que aporta el marcador de selección URA3+

### 6.2.7 Comparación de los componentes de la vía de señalización de la feromona en levaduras

Además de la feromona y su receptor, existen otros componentes de la vía que desempeñan un papel clave para que la célula genere una respuesta típica después de ser estimulada por la feromona. Debido a su importancia, algunos de los componentes de la vía de señalización de la feromona de *S. cerevisiae* se compararon con los componentes de *C. glabrata* y de otras siete levaduras (tanto sexuales como asexuales) con el fin de encontrar alguna diferencia clara en *C. glabrata* que pudiera ser la causa de la variación en la respuesta de esta levadura tras entrar en contacto con la feromona.

El primer paso consistió en obtener las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en formato fasta para cada uno de los genes y proteínas implicados en esta vía en *S. cerevisiae*. Estas se consiguieron en la base de datos de la página *Saccharomyces Genome Database* (SGD, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), la cual está a cargo del departamento de Genética de la escuela de Medicina de la Universidad Stanford, California.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se utilizaron como base para realizar la búsqueda de proteínas codificadas por genes homólogos presentes en otras especies de levaduras. Esto se realizó con la ayuda del programa informático Blastx, el cual forma parte de la familia BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) desarrollada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La búsqueda se delimitó a la clase de los hemiascomicetos, ya que tanto *S. cerevisiae* como *C. glabrata* pertenecen a esta. Las levaduras seleccionadas fueron *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*.

Una vez obtenidas las secuencias de las proteínas que conforman la vía de señalización de la feromona en cada una de las levaduras seleccionadas, se realizó un alineamiento múltiple de estas utilizando los programas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y MEGA 5<sup>46</sup>. A partir de los alineamientos se obtuvo el porcentaje de identidad de las proteínas de cada levadura con respecto a las de *S. cerevisiae*. Esta comparación nos permitiría saber qué tan parecidas son las proteínas de *C. glabrata* a las de *S. cerevisiae* según su secuencia, o bien, si estas tienden a ser más similares a las de las levaduras sexuales o asexuales y, de este modo, contemplar la posibilidad de una divergencia en sus funciones.

Además de la comparación de secuencias, la identificación de dominios conservados permite determinar similitud local o parcial entre las proteínas de las especies comparadas así como inferir una similitud de función. Para ello, se buscaron los dominios presentes en cada una de las proteínas de las nueve levaduras analizadas

mediante la herramienta de análisis de secuencia Pfam <sup>47</sup>, proporcionado por la página del Instituto Sanger (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A partir de estos dominios se realizó un cuadro comparativo con el fin de detectar alguna diferencia significativa, con respecto a *S. cerevisiae*, que pudiera indicar una variación en la función de las proteínas y, en consecuencia, ser la causa de la falta de una respuesta típica a la feromona por parte de *C. glabrata*.

Finalmente, se realizó un perfil filogenético de los genes de *S. cerevisiae* implicados en la vía de la feromona para denotar la presencia o ausencia de genes homólogos en otras especies. Este paso se realizó con ayuda de la herramienta PhyloPro <sup>48</sup> (<http://compsysbio.org/phylopro/>), la cual delimita la búsqueda de genes homólogos en organismos eucariotas. Además de mostrar la presencia de genes homólogos, el perfil filogenético generado con esta herramienta establece cinco tipos de relación homóloga: 1) no ortólogos, 2) un gen “referencia” tiene sólo un ortólogo en la especie “blanco” (1:1), 3) un gen de referencia tiene dos o más ortólogos en la especie blanco (1:muchos), 4) un gen de referencia junto con al menos un parálogo adicional, tienen un solo ortólogo en la especie blanco (muchos:1) y 5) un gen de referencia y al menos un parálogo adicional, poseen dos o más ortólogos en la especie blanco (muchos:muchos).

Con ayuda del perfil es posible establecer si estos genes, y las proteínas codificadas por ellos, se mantienen conservados a través de otros organismos debido a su importancia para el funcionamiento de las células. De este modo, se trató de proponer una relación entre la ausencia o divergencia en la función de alguno de los genes conservados con la aparente falta de un ciclo sexual en *C. glabrata*.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Construcción del vector pBC176/*CgSTE2*

Para poder evaluar la función del par feromona-receptor de *C. glabrata* se decidió expresar el gen *CgSTE2* en una cepa de *S. cerevisiae*  $\Delta ste2$ . Con este fin, se construyó un vector de clonación utilizando el plásmido replicativo de *S. cerevisiae* pBC176, el cual cuenta con el promotor *TEF1* que permite la correcta expresión del gen.

El primer paso consistió en extraer el DNA genómico de la cepa CGM99 de *C. glabrata* y, a partir de este, amplificar el gen *CgSTE2* mediante una reacción de PCR. Al finalizar la reacción, se tomaron 5  $\mu$ L de cada una de las tres muestras realizadas para llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se esperaba observar bandas de aproximadamente 1550 pb correspondientes al gen *CgSTE2*.

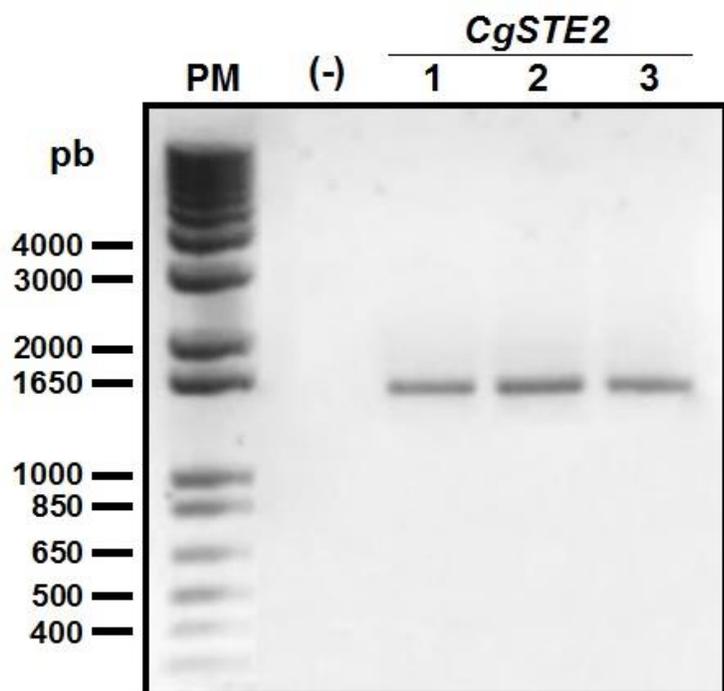


Fig. 14. Electroforesis en gel de los productos de PCR utilizando Taq Polimerasa. La amplificación del gen *CgSTE2* se realizó a partir del DNA genómico extraído de la cepa silvestre de *C. glabrata* Mata. Los productos de PCR resultantes poseen un peso molecular cercano al esperado (1550 pb). El control negativo (-) consistió en todos los reactivos de reacción, excepto el DNA genómico. PM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

La figura 14 muestra la imagen del gel resultante. En ella se aprecia que el control negativo de reactivos no presenta ninguna banda, lo que indica que las condiciones de trabajo, así como la esterilidad del material empleado durante la reacción, fueron adecuadas. En cuanto a las muestras de reacción, las tres presentan una banda por debajo del marcador de peso de 1650 pb, tal como se esperaba.

El gen *CgSTE2* obtenido en el paso anterior se encuentra flanqueado por los sitios de restricción de las enzimas *Xma*I y *Xho*I para facilitar su clonación en el plásmido pBC176. Sin embargo, ya que la posición de los sitios de corte se ubica en los extremos del gen, fue necesario subclonarlo un vector intermedio (pGEM-T) con el fin de favorecer la unión de las enzimas.

Una vez generada la construcción pGEM-T/*CgSTE2*, esta se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*. Las colonias obtenidas se seleccionaron de acuerdo al patrón de colonias azules/blancas resultantes de la inducción con IPTG/X-Gal, donde las colonias blancas son las que lograron insertar correctamente la construcción pGEM-T/*CgSTE2*. Se tomaron dos de estas colonias y se utilizaron para llevar a cabo una reacción de PCR de colonia que pudiera confirmar la presencia del gen *CgSTE2*, además de un ensayo enzimático para comprobar que el gen se clonó en el sitio correcto del vector.

Los resultados de la reacción de PCR de colonia confirman la presencia del gen en las células transformantes de *E. coli*. En la figura 15A se puede observar que ambas colonias analizadas presentan una banda por debajo del peso molecular de 1650 pb, similar a las mostradas en la figura 14, las cuales corresponden al gen *CgSTE2*.

Por otro lado, el ensayo enzimático se realizó con la enzima *Nco*I que posee dos sitios de corte en la construcción pGEM-T/*CgSTE2* (figura 11). Después de la digestión se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 1460 pb y otro de 3090 pb aproximadamente. Los resultados mostrados en la figura 15B sugieren que el gen *CgSTE2* se ligó

correctamente al vector pGEM-T. Por lo tanto, las muestras pueden utilizarse para proseguir con la metodología experimental planteada.

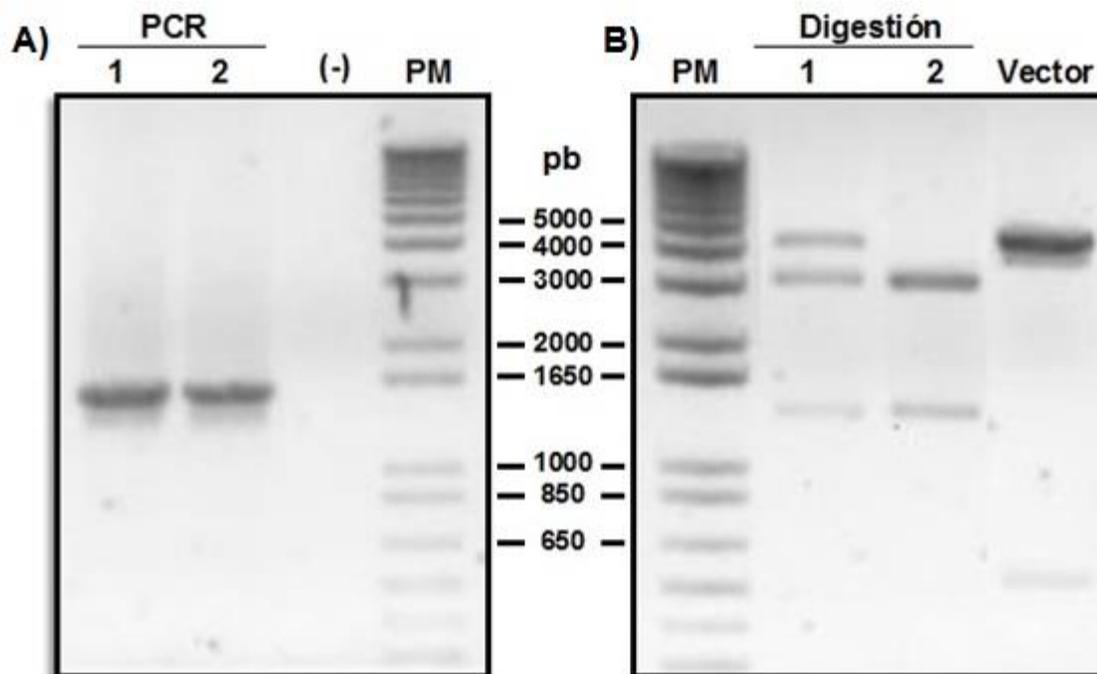


Fig. 15. Ensayos para comprobar la presencia del gen *CgSTE2* en dos las células transformantes de *E. coli* y su correcta clonación en el vector pGEM-T. A) Resultados de la PCR de colonia. Ambas colonias analizadas presentan bandas del tamaño esperado para el gen *CgSTE2*. B) Resultados del ensayo enzimático. El vector pGEM-T/*CgSTE2* sin digerir tiene un tamaño de 4550 pb, lo que corresponde con la banda mostrada en el carril del extremo derecho. Las bandas centrales presentan el patrón esperado después de digerir el vector con la enzima *NcoI* (1460 pb y 3090 pb aproximadamente). PM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

El siguiente paso consistió en extraer el gen *CgSTE2* de la construcción formada con el vector pGEM-T. Para ello, se realizó una doble digestión de las células transformantes de *E. coli* que contienen la construcción pGEM-T/*CgSTE2* utilizando las enzimas *XmaI* y *XhoI*. Al finalizar la reacción, las muestras se utilizaron para una electroforesis en gel de agarosa donde se esperaba obtener dos bandas, una correspondiente al vector pGEM-T (3000 pb) y otra al gen *CgSTE2* (1550 pb). Estas bandas se pueden apreciar en la figura 16A, la cual presenta el gel resultante después de la doble digestión de dos de las muestras obtenidas.

Al igual que el gen *CgSTE2*, el vector pBC176 se sometió a una doble digestión con las mismas enzimas *Xma*I y *Xho*I para generar los extremos cohesivos que permitirían su ligación con *CgSTE2*. Después de cortar con estas enzimas, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 5600 pb y 280 pb, donde el fragmento de mayor tamaño corresponde al vector de interés. La figura 16B muestra el resultado de esta digestión, observándose las bandas correspondientes a ambos fragmentos.

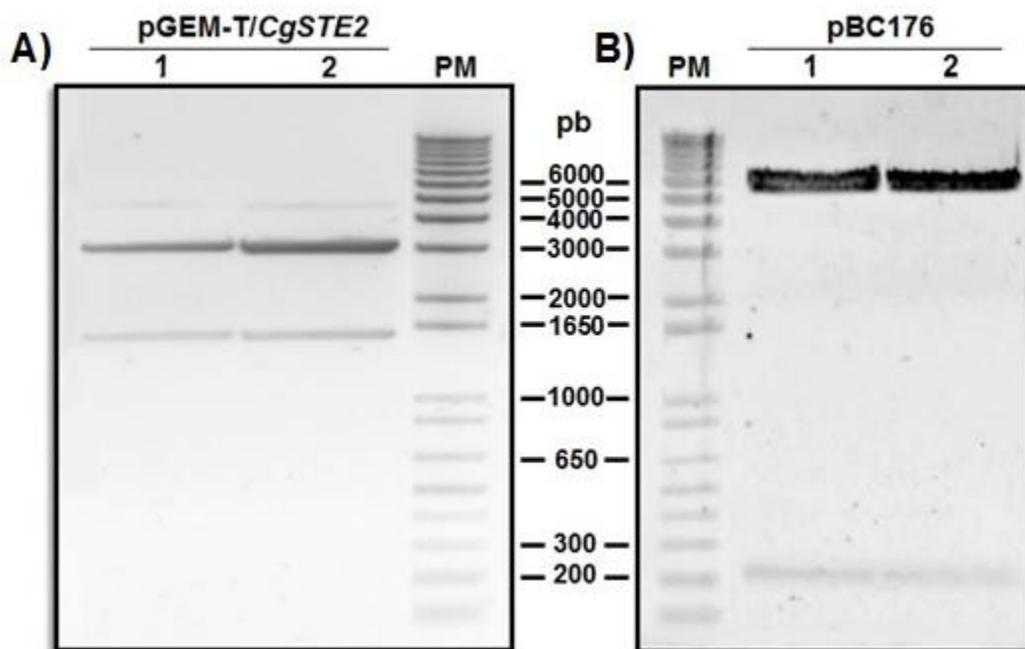


Fig. 16. Digestiones de la construcción pGEM-T/*CgSTE2* y del vector pBC176 con las enzimas *Xma*I y *Xho*I para generar los extremos cohesivos que facilitarán la subsecuente clonación de *CgSTE2* en pBC176. A) La digestión de pGEM-T/*CgSTE2* permitió separar la construcción en sus dos componentes, el vector pGEM-T (3000 pb) y el gen *CgSTE2* (1550 pb). B) Al cortar el vector purificado con las enzimas mencionadas se obtienen bandas cercanas a los 200 pb y 6000 pb. La banda de mayor tamaño corresponde a pBC176, cuyo tamaño es de 5600 pb aproximadamente. PM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

Después de la digestión, las bandas pertenecientes al gen *CgSTE2* y al vector pBC176 se cortaron del gel de agarosa y se purificaron con ayuda del kit *QIAquick Gel Extraction*. En el caso del gen, se obtuvieron doce muestras, las cuales se juntaron en grupos de tres y se secaron a vacío para generar cuatro muestras concentradas. En la figura 17 se presentan las muestras purificadas, tanto del gen como del vector.

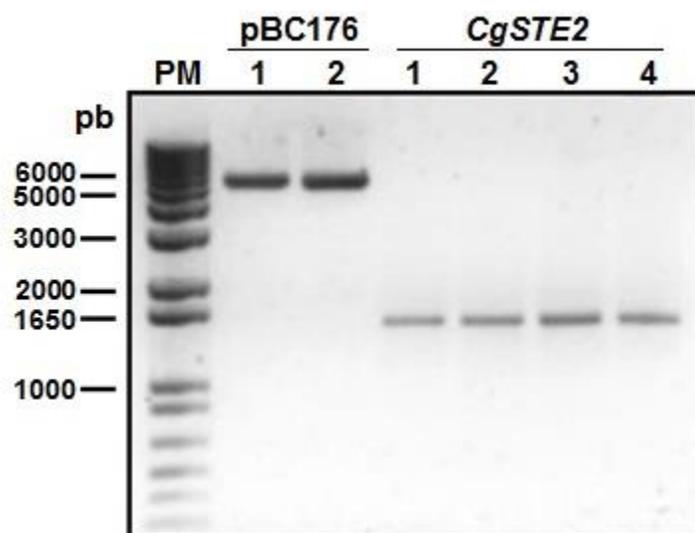


Fig. 17. Purificación del vector pBC176 y del gen *CgSTE2* después de digerir con las enzimas *Xma*I y *Xho*I. Las concentraciones obtenidas del vector fueron de 70.2 ng/ $\mu$ L y de 75.3 ng/ $\mu$ L, mientras que las cuatro muestras del gen tienen concentraciones de 12.1 ng/ $\mu$ L, 23.0 ng/ $\mu$ L, 31.5 ng/ $\mu$ L y 23.2 ng/ $\mu$ L respectivamente. PM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

Las muestras purificadas se utilizaron para llevar a cabo la ligación que daría origen a la construcción pBC176/*CgSTE2*. Esta construcción se utilizó para transformar las células competentes *E. coli* XLI-blue. Se obtuvieron once colonias de células transformantes, las cuales se emplearon para realizar cultivos Miniprep. A partir de estos, se efectuó un ensayo enzimático y una reacción de PCR para comprobar la presencia del gen *CgSTE2* y su clonación en el vector.

El ensayo con las enzimas *Xma*I y *Xho*I tenía como fin separar la construcción pBC176/*CgSTE2* para obtener, después de la electroforesis en gel, dos bandas de aproximadamente 5600 pb y 1550 pb correspondientes al vector y al gen respectivamente. En caso de observarse dichas bandas, se puede suponer que el gen *CgSTE2* se ligó correctamente al vector de clonación. Los resultados del ensayo enzimático (figura 18A) muestran que sólo una de las once colonias transformantes presenta el patrón de bandas esperado, mientras que las demás sólo muestran una banda cercana a las 6000 pb similar a la del vector pBC176 linealizado de la figura 17. Este resultado sugiere que la ligación del gen y el vector fue deficiente, hecho que se

confirma al observar los resultados de la reacción de PCR (figura 18B), ya que sólo se logró amplificar el gen *CgSTE2* a partir de la muestra número cuatro.

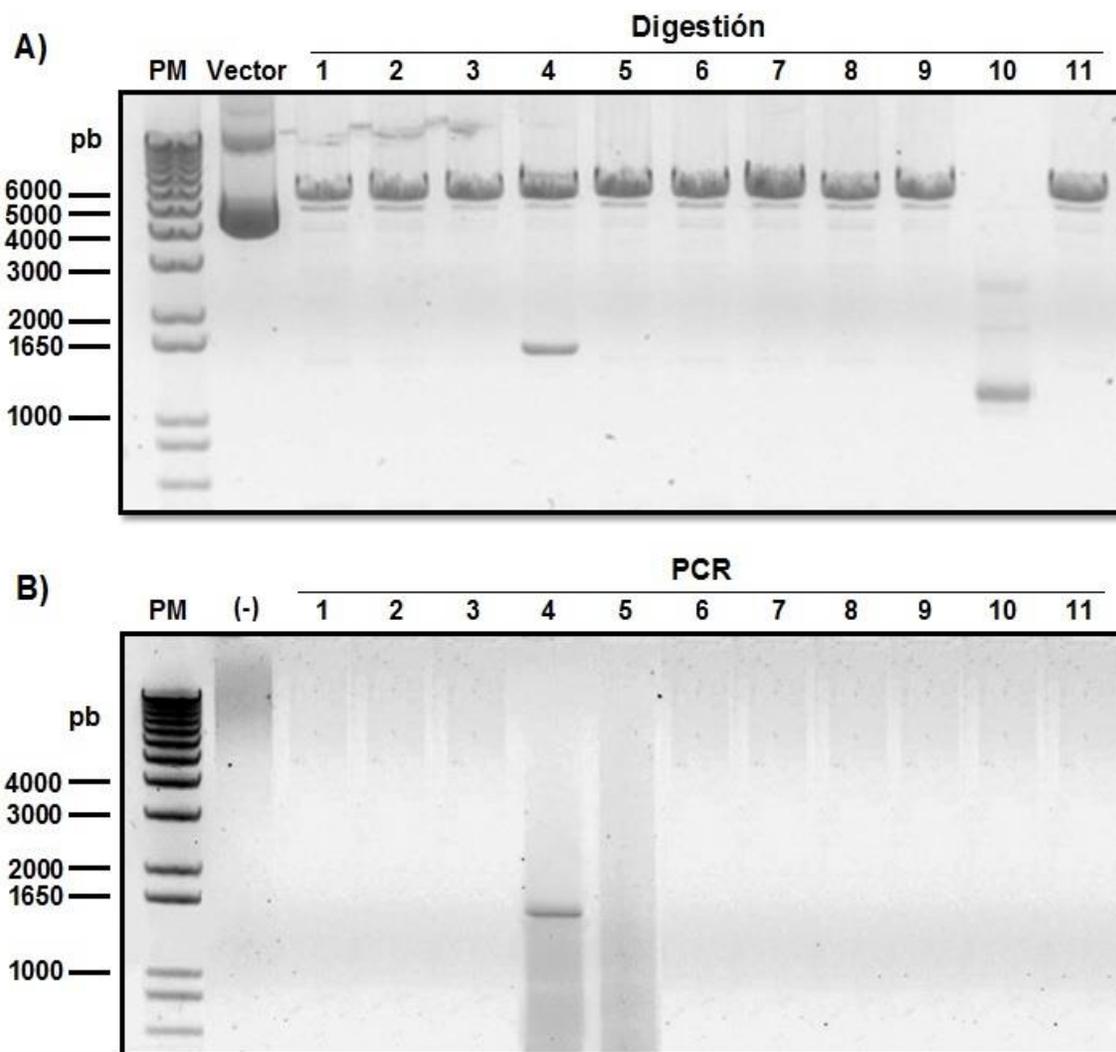


Fig. 18. Ensayos para comprobar la presencia del gen *CgSTE2* en las células transformantes de *E. coli* y su correcta clonación en el vector pBC176. A) Resultados del ensayo enzimático con *Xma*I y *Xho*I. Sólo la muestra número cuatro presentó el patrón de bandas esperado (1550 pb y 5600 pb aproximadamente, correspondientes al gen *CgSTE2* y al vector pBC176). El resto de las muestras sólo presentan una banda cercana a las 6000 pb similar a la del vector linealizado. La construcción pBC176/*CgSTE2* sin digerir se muestra en el carril 2. B) Resultados de la reacción de PCR para amplificar *CgSTE2*. La muestra número cuatro permitió amplificar el gen de interés, lo que no fue posible con el resto de las muestras. El control negativo de PCR (-) consistió en todos los reactivos de reacción a excepción de la muestra purificada. PM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

La muestra número cuatro tuvo resultados positivos para ambas pruebas, por lo que se utilizó para realizar una nueva transformación de células de *E. coli* XLI-blue y, de esta forma, contar con un respaldo de células transformantes que contuvieran la construcción pBC176/*CgSTE2*.

Una de las muestras Miniprep obtenidas a partir de las nuevas células transformantes se utilizó para la secuenciación del gen *CgSTE2*. Al comparar los resultados de la secuenciación con la secuencia nucleotídica del gen silvestre, se encontraron cinco mutaciones puntuales (tabla 4). Para saber si estas mutaciones en el gen habían alterado la secuencia del receptor CgSte2p, se compararon también las secuencias de aminoácidos y se encontraron tres aminoácidos mutados: isoleucina por valina en la posición 55 (Ile55Val), glicina por glutámico en la posición 108 (Gly108Lys) y valina por alanina en la posición 140 (Val140Ala).

Tabla 4. Mutaciones encontradas en el gen *CgSTE2* expresado en las células transformantes de *S. cerevisiae* y la consecuencia en la secuencia del receptor CgSte2p

<b><i>CgSTE2</i> silvestre</b>	<b><i>Cgste2</i> mutante</b>	<b>*Posición (pb)</b>	<b>Cambio de aminoácido</b>
T	A	138	-----
A	G	163	Ile55Val
G	A	323	Gly108Lys
T	C	419	Val140Ala
T	C	1185	-----
*Posición de los nucleótido mutados respecto al codón de inicio			

A partir de este punto, se denominará gen *Cgste2*, construcción pBC176/*Cgste2* y receptor Cgste2p en deferencia a las mutaciones presentes en el gen con el cual se está trabajando.

Debido a que las pruebas posteriores se realizarían sobre este receptor mutado, era necesario saber la importancia de las mutaciones encontradas ya que el resultado de los ensayos podría ser una consecuencia de estas. Para ello, se realizó un alineamiento

múltiple de las secuencia de aminoácidos de la proteína Cgste2p contra las proteínas Ste2p de otras especies de levaduras para determinar si las mutaciones se encuentran en sitios de residuos conservados.

El receptor silvestre de *C. glabrata* posee una isoleucina en la primer posición mutada de nuestro receptor Cgste2p (valina en la posición 55). Tanto valina como isoleucina poseen características fisicoquímicas similares, por lo que podemos suponer que esta primera mutación no tendrá gran impacto en los resultados posteriores. Además, la figura 19 muestra que la mayoría de las especies comparadas presenta un residuo de alanina en esta posición, la cual también comparte características fisicoquímicas con la valina presente en el receptor mutado.

Por otro lado, en el alineamiento múltiple también podemos observar que la glicina ubicada en la posición 108 del receptor silvestre CgSte2p es un residuo conservado en las especies analizadas. Sumado a lo anterior, el glutámico presente en la proteína mutante no posee características fisicoquímicas similares a las de la glicina, por lo que esta mutación podría tener un impacto mayor en la actividad del receptor Cgste2p. Sin embargo, en la figura 20 se puede observar que esta mutación se encuentra en la primer asa extracelular del receptor, la cual no ha sido reportada como indispensable para su activación ni para su unión a la proteína G<sup>19, 21-24, 49</sup>.

Finalmente, la última mutación obtenida para el receptor Cgste2p (alanina en la posición 140) se ubica en un sitio de residuos conservados, ya que la mayoría de las especies comparadas, incluyendo a la propia *C. glabrata*, poseen un residuo de valina en esta posición. Al tratarse de aminoácidos con características fisicoquímicas similares, se espera que esta mutación no influya en los resultados de los ensayos posteriores. Además, al igual que las dos mutaciones anteriores, esta no se ubica en una posición de relevancia funcional para el receptor.



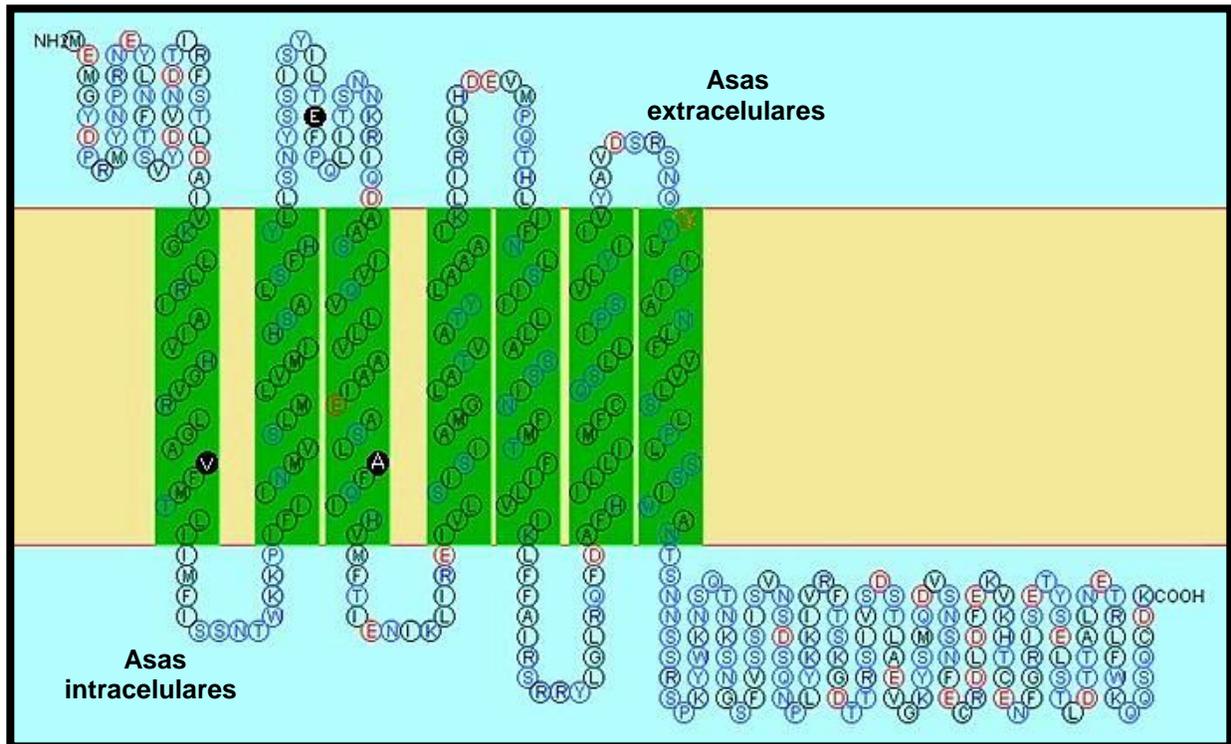


Fig. 20. Modelo de la estructura secundaria del receptor Cgste2p predicha con ayuda de la herramienta SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>). Los residuos mutados de este receptor se marcan con los círculos negros. Ninguna de las tres mutaciones se localizan en regiones que hayan sido reportadas como importantes para la activación del receptor, la unión a la proteína G o la unión al ligando <sup>19, 21-24, 49</sup>.

Sin embargo, estas observaciones deberán evaluarse por métodos experimentales diversos para comprobar la influencia de dichas mutaciones en la señalización mediada por esta variante del receptor CgSte2p.

## 7.2 Expresión del receptor Cgste2p en *S. cerevisiae*

La construcción pBC176/Cgste2 obtenida en el punto anterior se utilizó para transformar la cepa de *S. cerevisiae* Mata  $\Delta$ ste2 con el fin de lograr la expresión heteróloga del receptor Cgste2p. Las colonias resultantes de la transformación se seleccionaron gracias al marcador *URA3+* presente en el vector de clonación.

Antes de realizar los ensayos con la feromona  $\alpha$ , fue necesario determinar si el receptor se estaba expresando de forma correcta en las células transformantes. Para ello, se utilizó una medición relativa que permitiera comparar los niveles de expresión del mRNA de estas células contra las de una cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

El primer paso consistió en la extracción del RNA total de ambas cepas. Al finalizar la extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con formaldehído para evaluar la integridad del RNA extraído. En la figura 21 se observa el gel obtenido después de la electroforesis. Se puede apreciar la presencia de dos bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S para cada muestra, lo que sugiere que el RNA se encuentra intacto y se puede utilizar para la síntesis de cDNA.

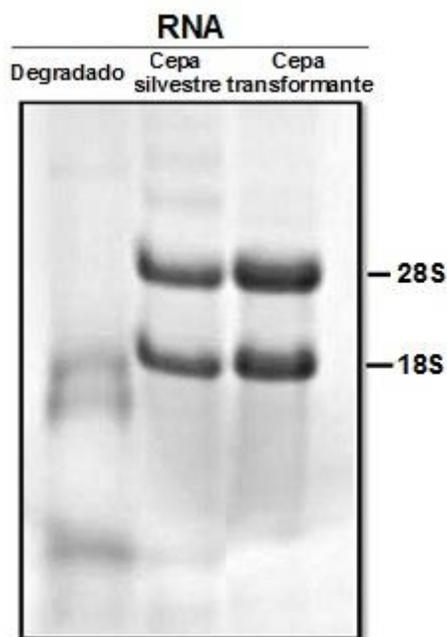


Fig 21. Gel de electroforesis de la extracción del RNA total. El carril de la izquierda presenta una muestra de RNA degradado que se utilizó como control para establecer la integridad del RNA obtenido. Las dos cepas de interés muestran dos bandas que corresponden al RNA ribosomal 28S y 18S, por lo que se deduce que la extracción se llevó a cabo de forma satisfactoria.

A partir del RNA obtenido, se llevó a cabo la síntesis de cDNA mediante la transcriptasa reversa seguida de una reacción de PCR que permitió amplificar el cDNA y, de esta forma, identificar el gen que está expresándose en las células. Después de la electroforesis en gel de las muestras de cDNA obtenidas, se esperaba encontrar bandas de aproximadamente 1290 pb, en el caso de la cepa silvestre, y de 1550 para la cepa transformante, las cuales corresponden al tamaño de los genes *ScSTE2* y *Cgste2* respectivamente. Ya que los resultados mostrados en la figura 22 coinciden con lo esperado, podemos suponer que el gen de *C. glabrata* y, en consecuencia, el receptor Cgste2p, se están expresando de forma correcta en la cepa de *S. cerevisiae* Mata  $\Delta ste2$ .

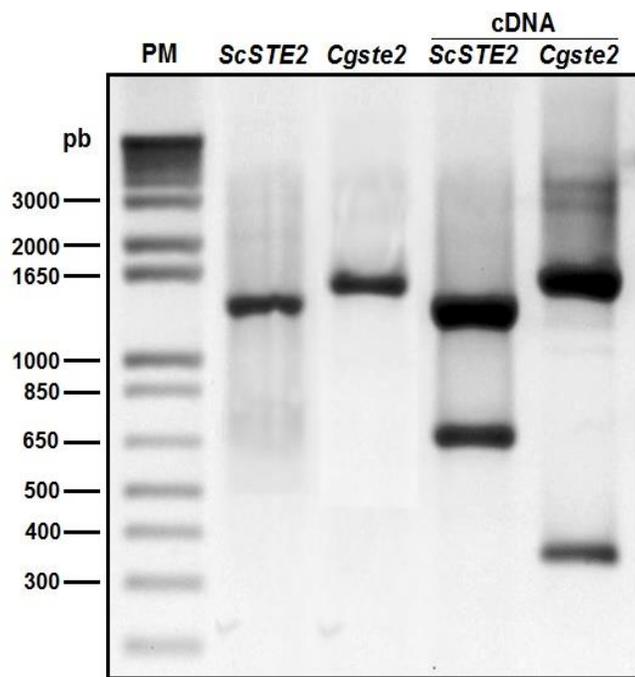


Fig. 22. Resultados de la expresión del gen *Cgste2* en *S. cerevisiae*. Las muestras de cDNA obtenidas presentan bandas del tamaño esperado (aproximadamente 1290 pb y 1550 pb para las cepas silvestre y transformante respectivamente), más una banda inespecífica de menor tamaño. El cDNA obtenido a partir de las células transformantes coincide con el control del gen *Cgste2* amplificado mediante PCR, lo cual indica que el gen se está expresando en dichas células de forma adecuada.

### 7.3 Ensayos con la feromona $\alpha$ de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata*

Los experimentos realizados a continuación tenían como objetivo probar si el receptor Cgste2p es capaz de reconocer a la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata* y, una vez formado el par feromona-receptor, acoplarse a la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae* para generar la respuesta típica.

#### 7.3.1 Arresto del ciclo celular

Una de las respuestas esperadas tras la señalización de la feromona es el arresto del ciclo celular<sup>31</sup>. Para determinar si el receptor Cgste2p es capaz de inducir esta respuesta, las células de *S. cerevisiae* que están expresando este receptor, así como las células de las cepas silvestre y  $\Delta ste2$  de *S. cerevisiae* Mata, fueron estimuladas con 15  $\mu$ M de la feromona  $\alpha$  de esta misma especie. Las muestras se colocaron en un multilector de placas Synergy para medir el crecimiento celular.

Después de 24 horas, se obtuvieron las curvas de crecimiento mostradas en la figura 23. En ella se observa que el crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* es escaso debido a que la feromona  $\alpha$  se unió correctamente a su receptor y provocó el arresto de las células en la fase G1. Caso contrario, la cepa  $\Delta ste2$  no puede reconocer a la feromona ya que no cuenta con el receptor correspondiente, por lo que presenta un crecimiento exponencial típico. La evaluación de las células expresando el receptor Cgste2p se realizó por duplicado para generar las muestras 1 y 2. En ambas se puede observar que, a la concentración ensayada, se obtiene un crecimiento similar al mostrado por la cepa  $\Delta ste2$ , lo que sugiere que el receptor Cgste2p no está reconociendo a la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, o bien, su unión a ella no desencadena la respuesta típica esperada.

El ensayo se realizó dos veces más para tener un total de tres repeticiones.

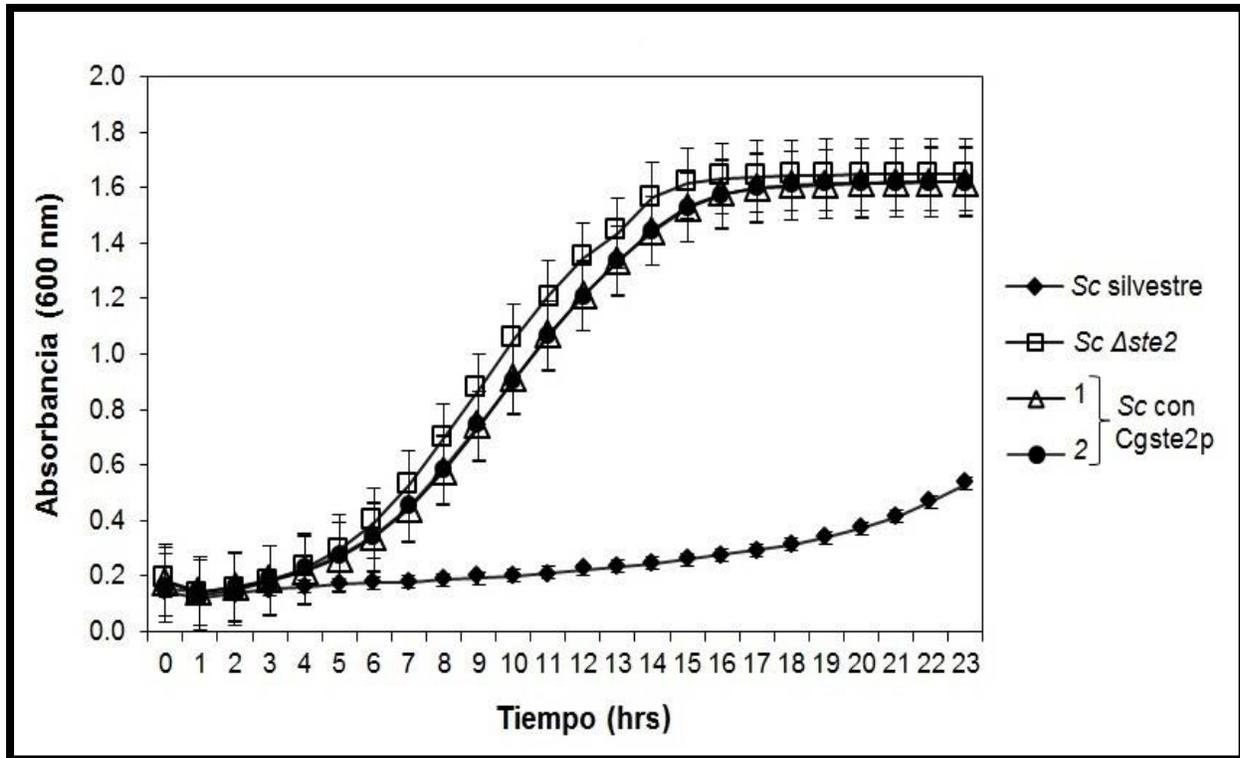


Fig. 23. Ensayo de arresto celular con feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. 24 horas después de su exposición con la feromona  $\alpha$  (15  $\mu$ M), la cepa silvestre presenta una disminución en su crecimiento debido al arresto del ciclo celular (◆). Por su parte, las células  $\Delta ste2$  presentan un crecimiento exponencial típico, es decir, su crecimiento no se ve disminuido tras entrar en contacto con la feromona (□). De igual forma, las dos muestras de las células que están expresando el receptor Cgste2p no presentan una disminución de su crecimiento después de su exposición a la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* ( $\Delta$  y ●). Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones tras tres repeticiones.

La feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* también se probó en las células de *S. cerevisiae* silvestres,  $\Delta ste2$  y las que expresan el receptor Cgste2p, además de probarse en células silvestres de *C. glabrata*. Se utilizaron cinco concentraciones distintas de feromona entre 2  $\mu$ M y 50  $\mu$ M. Todas ellas provocaron que el crecimiento de las células que expresan el receptor Cgste2p se viera disminuido (en comparación con las células silvestres), siendo en las muestras con 50  $\mu$ M de feromona donde se observa menor crecimiento (figura 24).

Contario a lo sucedido con la feromona de *S. cerevisiae*, la cepa silvestre y la cepa  $\Delta ste2$  de *S. cerevisiae* presentan el mismo patrón de crecimiento al ser incubadas con

la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*, es decir, ambas presentan una curva de crecimiento exponencial sin ninguna alteración. Esto sugiere que la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* no logra unirse correctamente al receptor silvestre ScSte2p o, si lo hace, no activa la ruta de señalización hasta generar el arresto del ciclo celular.

Finalmente, las células de la cepa silvestre de *C. glabrata* tampoco arrestan su crecimiento al ser estimuladas por la feromona  $\alpha$ , mostrando un crecimiento incluso mayor y en menor tiempo que el observado en las células silvestres de *S. cerevisiae*.

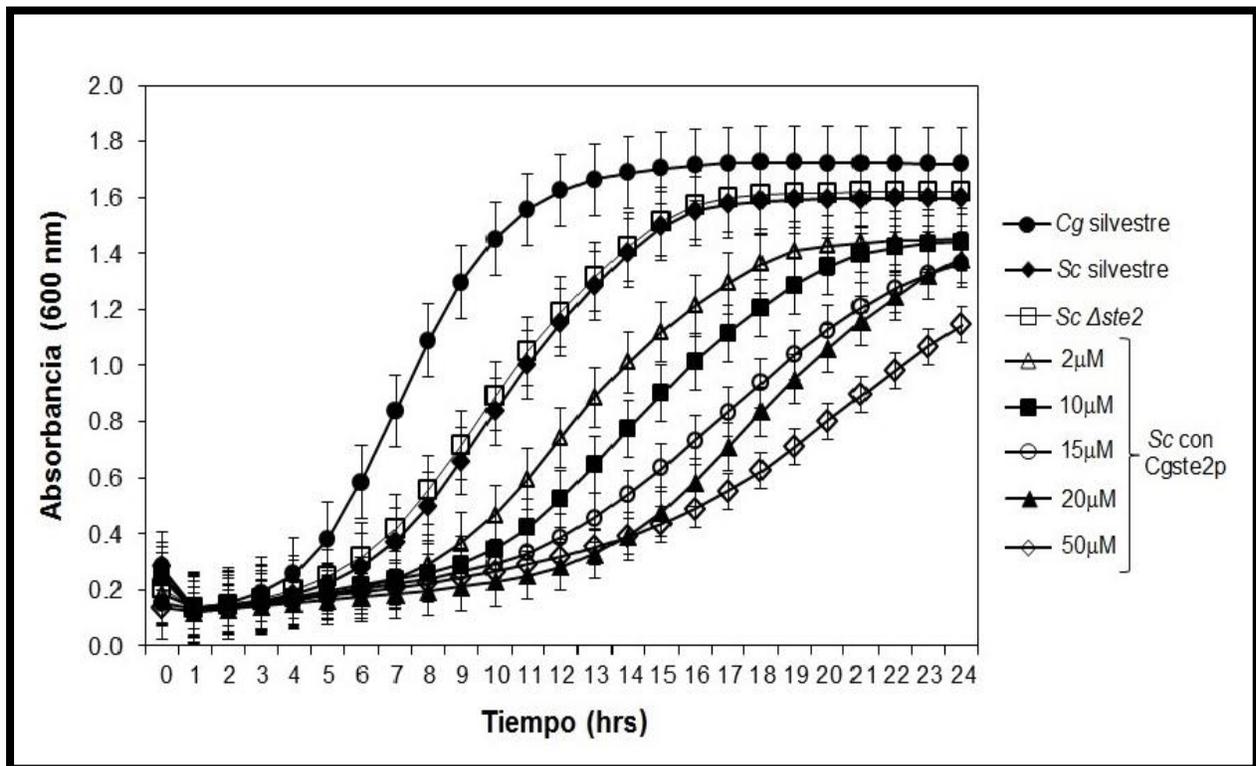


Fig. 24. Ensayo de arresto celular con feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*. Las células de cada cepa evaluada se estimularon con cinco concentraciones distintas de feromona. La cepa silvestre de *C. glabrata* ( $\bullet$ ), así como las cepas silvestre ( $\blacklozenge$ ) y  $\Delta ste2$  ( $\square$ ) de *S. cerevisiae* presentan un crecimiento exponencial normal, es decir, no se observa una disminución tras su exposición a la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*. Las curvas de crecimiento de estas tres son el promedio de las mediciones obtenidas para las cinco concentraciones evaluadas. Por otro lado, las células de *S. cerevisiae* que expresan el receptor Cgste2p presentan una respuesta positiva, ya que su crecimiento se ve disminuido a medida que aumenta la concentración de feromona. Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones después de tres repeticiones.

A partir de estos resultados podemos concluir que el receptor Cgste2p presenta mayor afinidad con la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* ya que esta unión logró generar el arresto del crecimiento celular, no así con la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. Sin embargo, es necesario evaluar más concentraciones de la feromona de *S. cerevisiae* para determinar si, a mayor concentración, el arresto celular puede presentarse.

### 7.3.2 Formación del fenotipo *shmoo*

Además del arresto celular, la activación de la vía de señalización de la feromona induce una alteración en la morfología de las células, generando las elongaciones conocidas como *shmoo*<sup>36</sup>. Para determinar si las células que expresan el receptor Cgste2p presentan estas elongaciones tras su contacto con la feromona, se incubaron durante 2 horas con las feromonas  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata* a una concentración de 15  $\mu$ M. Este mismo procedimiento se realizó en las cepas silvestre y  $\Delta$ ste2 de *S. cerevisiae*. Posteriormente, se observaron al microscopio alrededor de 200 células para cada cepa y cada feromona ensayada.

Las células silvestres de *S. cerevisiae* presentan la morfología piriforme característica de las elongaciones *shmoo* después de ser expuesta a su propia feromona  $\alpha$  (figura 25A). Por su parte, la incubación de las células que están expresando el receptor Cgste2p con la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* genera que estas células adquieran una morfología alargada más prominente que la mostrada por la cepa silvestre (figura 25E), aunque sólo alrededor del 50% de esta morfología es similar al *shmoo*.

La exposición a la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* no generó un cambio en la morfología de las células silvestres de *S. cerevisiae* (figura 25B), ya que estas presentan una forma circular similar a la que se observa en las células de la cepa  $\Delta$ ste2 de *S. cerevisiae*, las cuales fueron usadas como control negativo del experimento (figuras 25C y 25D). Sin embargo, esta feromona sí generó un cambio en la morfología de las células que poseen el receptor Cgste2p ya que se observa un *shmoo* discreto, ligeramente curvo, en aproximadamente el 25-30% de las células (figura 25F).

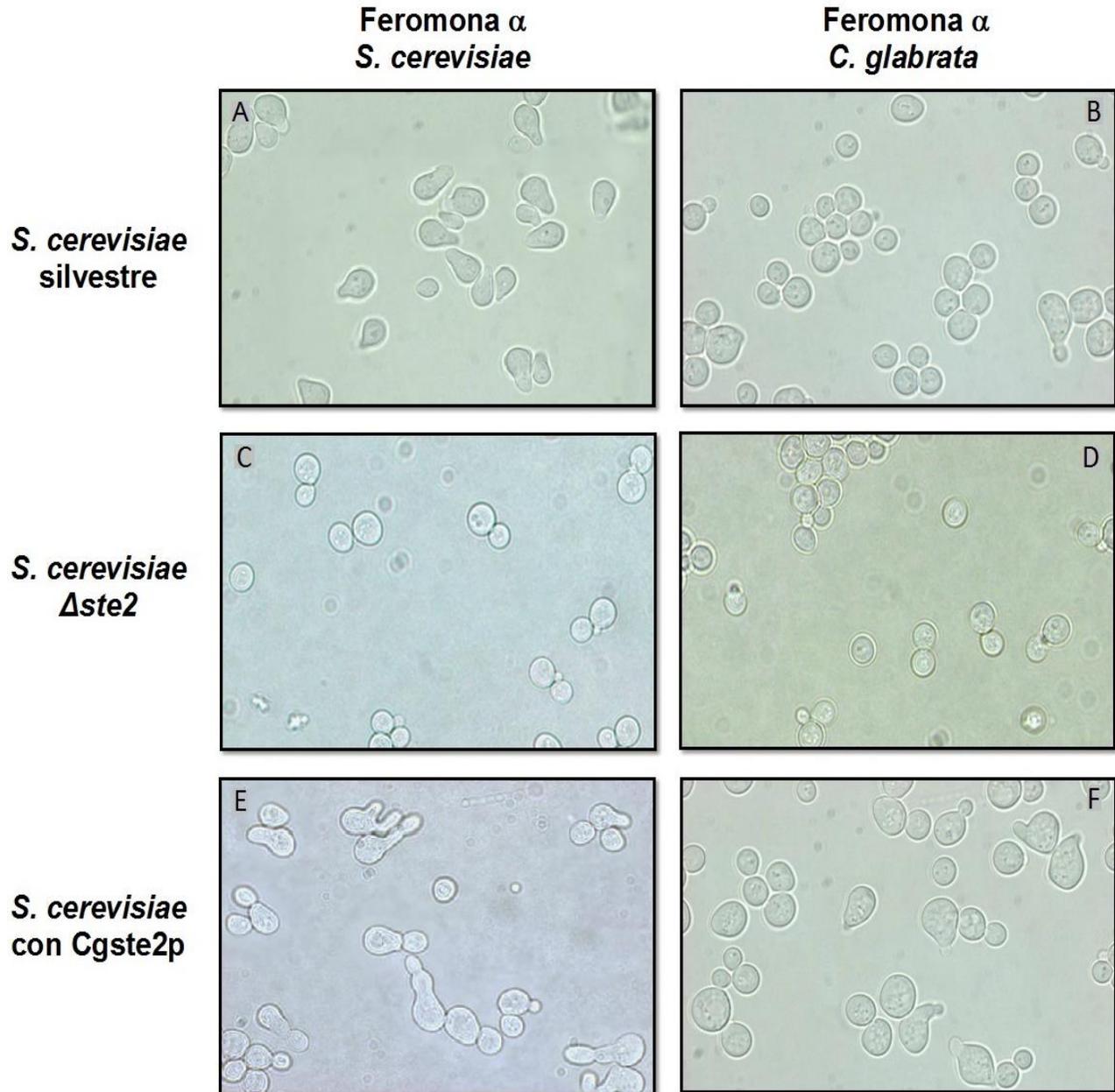


Fig. 25. Respuesta morfológica de las células de *S. cerevisiae* silvestres,  $\Delta ste2$  y las que están expresando el receptor Cgste2p tras su incubación con feromona  $\alpha$  (15  $\mu$ M) durante 2 horas. A) Las células silvestres presentan las elongaciones piriformes características del *shmoo* al ser estimuladas por la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. B) La morfología de las células silvestres no se vio alterada después de estar en contacto con la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*. C y D) Las células que poseen una delección del gen *ScSTE2* ( $\Delta ste2$ ) no alteran su morfología al entrar en contacto con ninguna de las dos feromonas, por lo que fueron utilizadas como control negativo del experimento. E) Por su parte, las células que están expresando el receptor Cgste2p presentan la morfología del *shmoo* tras el contacto con la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. F) La feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* también genera un cambio en la morfología de las células que poseen el receptor Cgste2p. Sin embargo, el *shmoo* observado es ligeramente curvo y se encuentra en menor proporción que el generado por la feromona de *S. cerevisiae*.

De estos resultados podemos concluir que el receptor Cgste2p, tras su unión a feromona, activa el mecanismo necesario para generar las elongaciones tipo *shmoo*. La diferencia en la cantidad de células que presentan esta morfología entre los dos tipos de feromonas podría deberse a que la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* requiere una mayor concentración para generar un efecto similar al presentado por la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, lo cual es acorde con lo observado en los ensayos de arresto celular.

### 7.3.3 Apareamiento entre células haploides

Una de las finalidades de la activación de la vía de señalización de la feromona es el apareamiento celular<sup>27</sup>. Para probar si las células de *S. cerevisiae* que están expresando el receptor Cgste2p pueden cumplir con este fin, se realizó un ensayo de apareamiento entre estas células y las células de la cepa Mata $\alpha$  silvestres. El ensayo se basó en la complementación de las auxotrofías presentes en cada cepa como consecuencia del apareamiento, tal como se muestra en la tabla de la sección 6.2.6.3.

El control positivo consistió en el apareamiento de las cepas Mata $\alpha$  y Mata $\alpha$  de *S. cerevisiae*. Mata $\alpha$  silvestre (BY4742) tiene, entre otras, auxotrofías para lisina y uracilo, mientras que la cepa Mata $\alpha$  silvestre (BY4741) presenta auxotrofia para metionina y para uracilo. Al estriar estas células haploides en medio SD-lys-met, ninguna de las dos creció (figura 26B y 26C). Sin embargo, el apareamiento entre estas células dio origen al diploide Mata $\alpha$ /Mata $\alpha$  que es capaz de crecer en este medio debido a la complementación auxotrófica (figura 26A).

Las células que están expresando el receptor Cgste2p parten de la cepa Mata $\alpha$   $\Delta$ ste2, por lo que poseen auxotrofia para metionina y uracilo. No obstante, el vector pBC176 donde se clonó el gen *Cgste2* posee el marcador de selección *URA3+*, permitiendo que estas células puedan crecer en medio mínimo sin uracilo. Por lo tanto, el ensayo de apareamiento de estas células se llevó a cabo en medio SD-lys-met-ura. Al igual que en el control positivo, al estriar las células silvestres Mata $\alpha$  en este medio no se observó

crecimiento, así como tampoco crecieron las células que expresan el receptor Cgste2p (figura 26E y 26F respectivamente). En caso de que el receptor Cgste2p hubiera reconocido de forma adecuada a la feromona  $\alpha$  secretada por las células *Mata* $\alpha$ , y viceversa, el apareamiento entre estas células daría origen a una célula diploide capaz de crecer en el medio de selección. Sin embargo, la figura 26D no muestra crecimiento celular después de poner en contacto ambas células, lo que sugiere que no se llevó a cabo el apareamiento y que no se formó la célula diploide.

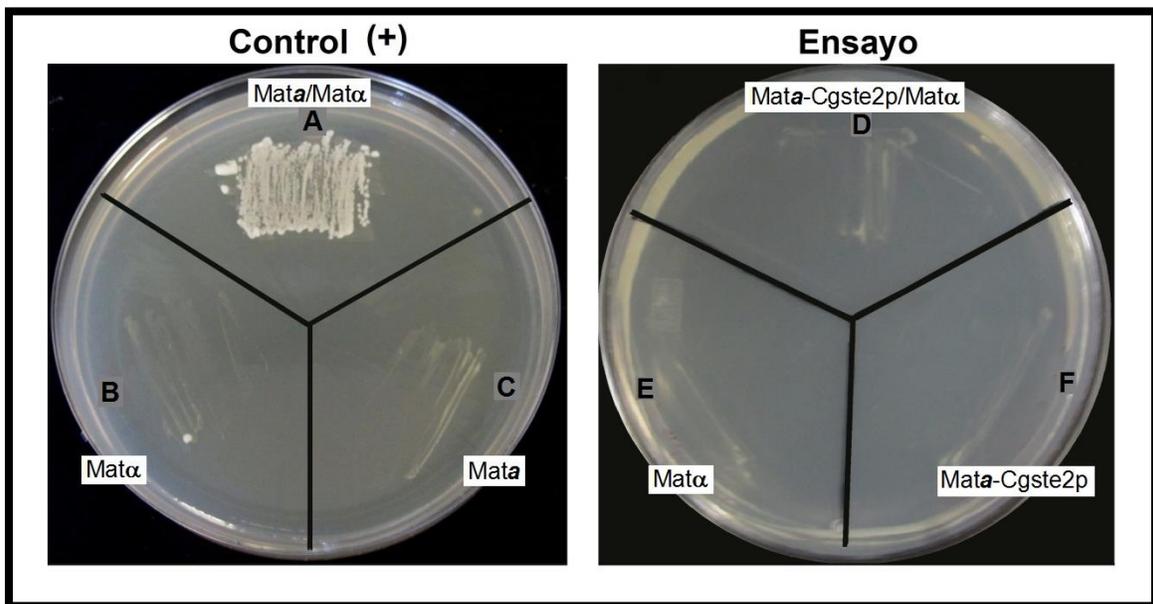


Fig. 26. Resultados del ensayo de apareamiento después de realizar el cruce de las cepas *Mata* y *Mata* $\alpha$  durante 48 horas a 30 °C. A) El control positivo consistió en el estriado de las células silvestres de *S. cerevisiae* *Mata* $\alpha$  y *Mata*. El cruce de estas células generó el diploide *Mata/Mata* $\alpha$  que complementa las auxotrofías individuales de cada cepa, por lo que pudo crecer en el medio de selección SD-lys-met. B) La cepa *Mata* $\alpha$  silvestre no es capaz de crecer en el medio de selección. C) De igual forma, la cepa *Mata* silvestre no creció en el medio de selección debido a sus auxotrofías. D) El cruce de las células *Mata* $\alpha$  silvestre y *Mata* que están expresando el receptor Cgste2p no condujo a la formación de un diploide capaz de crecer en el medio de selección. E) La cepa *Mata* $\alpha$  silvestre tampoco crece en el medio SD-lys-met-ura ya que posee auxotrofia para lisina y uracilo. F) Las células de *S. cerevisiae* que expresan el receptor Cgste2p no crecieron en el medio SD-lys-met-ura debido a que esta cepa tiene auxotrofías para metionina y para uracilo.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de apareamiento de las células que expresan el receptor Cgste2p después de ser estimuladas con la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*. Las

células se incubaron con tres concentraciones distintas de feromona durante 2 horas y, posteriormente, se estriaron en medio SD-lys-met-ura junto con las células de la cepa *Mat $\alpha$*  silvestre. En este caso, tampoco se observó formación del diploide a ninguna de las concentraciones de feromona utilizadas, obteniéndose resultados similares al mostrado en la figura 26D-F.

Estos resultados sugieren que a pesar de que el receptor *Cgste2p*, tras su unión a la feromona  $\alpha$  de ambas especies, activa el mecanismo necesario para generar las elongaciones tipo *shmoo*, dichas elongaciones no favorecen el apareamiento de las células, o bien, la unión feromona-receptor no permite que se lleve a cabo este proceso.

#### **7.4 Comparación de los componentes de la vía de señalización de la feromona en levaduras**

Aunque el par feromona-receptor es indispensable para la activación de la vía de señalización de la feromona, los componentes que se ubican río abajo en esta cascada también juegan un papel muy importante ya que la correcta interacción entre ellos permitirá que la señal sea transmitida hasta generar la respuesta esperada. Por tal motivo, se realizó un análisis comparativo de las proteínas implicadas en esta vía en nueve diferentes especies de levaduras.

##### **7.4.1 Análisis de secuencias**

El primer análisis consistió en el alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas de esta vía en algunas levaduras sexuales (*S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *K. lactis*, *D. hansenii* y *Y. lipolytica*) y asexuales (*C. glabrata*, *A. gossypii*, *C. tropicalis* y *C. albicans*). A partir de los resultados del alineamiento realizado con ClustalW se obtuvo una comparación de los porcentajes de identidad de estas proteínas con respecto a *S. cerevisiae*, la cual se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la vía de señalización de feromona en *S. cerevisiae* y porcentaje de identidad de las proteínas homólogas de otras especies

Proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	Porcentaje de Identidad							
	Z. <i>rouxii</i>	K. <i>lactis</i>	D. <i>hansenii</i>	Y. <i>lipolytica</i>	C. <i>glabrata</i>	A. <i>gossypii</i>	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>albicans</i>
Ste2p	41.99	47.49	<b>28.85</b>	30.68	41.43	39.20	<b>27.95</b>	<b>24.74</b>
Ste3p	47.05	49.65	<b>29.84</b>	<b>27.20</b>	52.88	46.95	32.60	31.78
Gpa1p	73.35	64.55	64.93	46.68	73.99	73.99	64.40	65.97
Ste4p	62.62	50.72	45.80	31.02	56.76	56.22	41.63	44.39
Ste18p	64.89	53.33	39.13	<b>26.47</b>	62.50	46.73	35.56	37.08
Ste5p	43.39	<b>27.45</b>	14.64	12.55	30.98	<b>27.59</b>	11.36	18.67
Bem1p	61.50	60.42	37.45	32.74	61.91	55.37	37.70	36.99
Cdc24p	65.30	57.33	33.46	<b>28.07</b>	64.76	57.79	33.42	32.47
Cdc42p	94.76	96.86	87.43	84.29	96.86	93.72	86.91	87.43
Bni1p	56.56	45.06	34.32	<b>26.57</b>	63.47	46.67	32.38	<b>24.12</b>
Ste20p	56.24	50.51	39.14	37.44	50.12	53.64	40.02	49.04
Ste11p	67.76	60.15	46.06	39.48	65.48	63.19	42.86	44.11
Ste50p	52.72	42.47	<b>26.65</b>	<b>21.82</b>	54.86	43.42	<b>29.15</b>	<b>27.19</b>
Ste7p	59.27	49.18	36.47	32.01	49.65	48.43	34.82	35.32
Fus3p	79.89	71.67	62.32	60.00	79.77	70.49	60.87	61.74
Kss1p	81.69	75.97	62.07	60.34	58.73	76.16	61.78	61.89
Msg5p	38.79	31.56	<b>29.41</b>	<b>27.79</b>	41.28	<b>28.70</b>	<b>25.65</b>	<b>24.10</b>
Ste12p	----	35.97	<b>29.68</b>	<b>22.19</b>	<b>30.07</b>	36.24	<b>28.69</b>	<b>29.01</b>
Dig1p	16.75	11.28	----	----	13.21	<b>21.15</b>	----	----
Dig2p	<b>23.68</b>	----	<b>21.63</b>	----	----	<b>28.83</b>	----	----
Far1p	<b>26.62</b>	12.33	9.79	9.40	<b>20.28</b>	8.92	8.62	9.90
Fus1p	42.13	<b>21.59</b>	16.62	12.95	<b>24.63</b>	<b>20.22</b>	<b>20.11</b>	19.95

Las líneas (----) significan que no se encontró la proteína homóloga en dicha especie. La escala de gradiente de colores ilustra los niveles de identidad, desde una identidad alta (verde) hasta una identidad muy baja (rojo) respecto a *S. cerevisiae*. Se anotan con negrita los valores que caen dentro de la llamada *Twilight zone*.

El alineamiento de secuencias es una herramienta útil para inferir la relación evolutiva de dos proteínas así como la similitud de sus estructuras y de su función<sup>50, 51</sup>. En este caso, al comparar proteínas de especies sexuales y asexuales se pretendía establecer una relación entre la similitud de las secuencias y la sexualidad. Se esperaba que las levaduras que poseen un ciclo de reproducción sexual mostraran un porcentaje de identidad mayor con respecto a *S. cerevisiae*, lo cual sugeriría que sus proteínas

cumplen la misma función dentro de esta vía. Por el contrario, siguiendo esta misma idea, las proteínas de las levaduras asexuales, incluyendo *C. glabrata*, deberían mostrar porcentajes de identidad menores sugiriendo una divergencia en sus secuencias y en sus funciones.

Lo primero que salta a la vista al observar los resultados de la tabla 5 es que las proteínas más diferentes, es decir, las que poseen los porcentajes de identidad más bajos respecto a *S. cerevisiae*, son las que se encuentran al final de la vía (Msg5p, Ste12p, Dig1p, Dig2p, Far1p y Fus1p). La importancia de este resultado radica en que la diferencia en las secuencias de estas proteínas podría significar una diferencia en su función y, en consecuencia, la transcripción de genes sexuales, el arresto del ciclo celular, la polarización y la fusión celular inducidos por feromona no se llevarían a cabo de la misma forma en que se observa en *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos valores se observan por igual en levaduras sexuales como asexuales por lo que es necesario analizar a más detalle las secuencias de dichas proteínas para identificar en qué regiones se encuentran las diferencias.

Otro aspecto que llama la atención de la tabla anterior es la falta de proteínas homólogas para Dig1p y/o Dig2p en la mayoría de las levaduras de estudio. Estas proteínas tienen una función redundante y se ha demostrado que la ausencia de una o ambas no inhibe la respuesta a la feromona sino que, por el contrario, podría provocar una elevada expresión de los genes inducidos por esta<sup>52</sup>. Por ende, la ausencia de homólogos para Dig1p y/o Dig2p no parece estar relacionada con la falta de respuesta sexual en las levaduras.

El análisis general de la tabla 5 no permitió encontrar una relación entre la similitud de las secuencia y la sexualidad ya que se observa una gran diferencia en los valores obtenidos dentro de ambos grupos de levaduras. Las proteínas de *C. glabrata*, a pesar de ser una levadura asexual, son más similares a las de *S. cerevisiae* que las de *D. hansenii*, *K. lactis* y *Y. lipolytica*, obteniendo porcentajes de identidad muy similares a los de las proteínas de *Z. rouxii*. Así mismo, los porcentajes de identidad obtenidos

para las proteínas de *D. hansenii* y *Y. lipolytica* son más parecidos a los de *C. albicans* y *C. tropicalis* que a los del resto de levaduras sexuales. La comparación de estos resultados con la relación filogenética mostrada en la imagen 1, sugiere que la semejanza de las secuencias proteínicas de estos organismos se encuentra en función de su cercanía filogenética y no tanto de su tipo de reproducción.

Hablando exclusivamente de *C. glabrata*, se observa que la mayoría de las proteínas presentan un porcentaje de identidad superior al 50%, lo que sugiere que estas se encuentran relacionadas con las proteínas de *S. cerevisiae* y que podrían poseer funciones similares. Esto no ocurre con CgSte5p, CgSte12p, CgFar1p y CgFus1p, cuyos porcentajes de identidad caen dentro de una zona de umbral denominada *Twilight zone* (20-30%) en la cual es difícil asegurar esta relación evolutiva basándose únicamente en el alineamiento<sup>51, 53</sup>.

En el caso de CgDig1p, el porcentaje de identidad obtenido es incluso menor al 20%, lo que podría insinuar que esta proteína no se encuentra muy relacionada a la proteína de *S. cerevisiae* y que no comparten estructura ni función. No obstante, este resultado no es concluyente ya que algunos estudios han demostrado que proteínas con porcentajes de identidad menores al 15% pueden poseer una conformación estructural similar<sup>51, 54, 55</sup>, lo que podría llevarlas a desempeñar funciones similares.

Considerando las diferencias observadas en este análisis así como su repercusión en la señalización de la feromona, podemos sospechar que las proteínas CgSte5p, CgFar1p, CgFus1p y CgSte12p están involucradas en la falta de una respuesta sexual por parte de *C. glabrata*. No obstante, para confirmar lo anterior se requieren análisis más detallados, tanto de las secuencias como de las estructuras de estas proteínas.

### 7.4.2 Comparación de dominios

La comparación de secuencias no es la única herramienta para determinar qué tan similares son dos proteínas. Otro de los métodos ampliamente utilizados es la

búsqueda de dominios conservados ya que estos pueden indicar similitud local o parcial entre proteínas, además de ser una clave sobre la función de las mismas<sup>56</sup>. La importancia de los dominios radica en que estos pueden mediar el transporte de las proteínas a sitios específicos de la célula, permitir el reconocimiento e interacción entre proteínas y/o segundos mensajeros así como controlar la conformación, actividad y especificidad de algunas enzimas, entre otras<sup>57</sup>.

En este caso, se buscaba identificar qué dominios poseen las proteínas que forman parte de la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae* y determinar si dichos dominios se conservan en las proteínas de un grupo dado de levaduras. La presencia o ausencia de estos dominios nos dará un indicio sobre la similitud de la ruta de la feromona en *C. glabrata* y, posiblemente, arroje pistas sobre la causa de un ciclo sexual “inexistente” en esta levadura.

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la herramienta Pfam para buscar los dominios presentes en cada una de las proteínas de la vía para todas las especies comparadas. Los dominios encontrados en *S. cerevisiae* se muestran en la figura 27.

Como se puede observar, las proteínas Dig1p, Dig2p, Far1p y Fus1p no están representadas en esta imagen ya que no se encontraron dominios asociados a ellas. También podemos apreciar que aproximadamente el 40% de las proteínas tienen más de un dominio (proteínas multidominio<sup>58</sup>), lo que sugiere que estas proteínas poseen más de una función y que son componentes indispensables para interacciones múltiples dentro de esta u otra vía. Tal es el caso de Cdc24p, Ste20p y Ste5p, las cuales, además de ser efectores de la vía, permiten la unión e interacción de otras proteínas así como la localización de estos complejos en su sitio de acción<sup>24, 27</sup>.

Por otro lado, en la tabla 6 se presenta la comparación de los dominios encontrados en las proteínas de las levaduras seleccionadas.

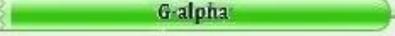
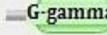
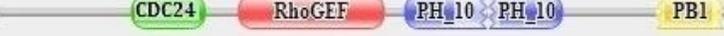
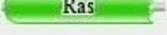
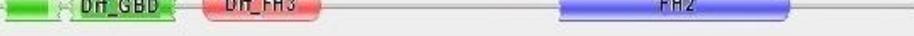
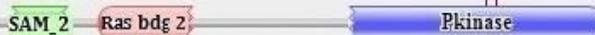
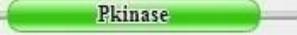
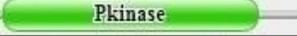
Proteínas	Dominios en <i>S. cerevisiae</i>
Ste2p	
Ste3p	
Gpa1p	
Ste4p	
Ste18p	
Ste5p	
Bem1p	
Cdc24p	
Cdc42p	
Bni1p	
Ste20p	
Ste11p	
Ste50p	
Ste7p	
Fus3p	
Kss1p	
Msg5p	
Ste12p	

Fig. 27. Dominios encontrados en las proteínas que forman parte de la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae*. Los dominios se obtuvieron con la herramienta de análisis de secuencias Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Algunas de estas proteínas poseen más de un dominio, mientras que otras (Dig1p, Dig2p, Far1p y Fus1p) no poseen ningún dominio registrado en Pfam, por lo que no se incluyen en la imagen.

Tabla 6. Comparación de los dominios presentes en las proteínas de la vía de señalización de la feromona en algunas levaduras

Proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	Dominios en <i>S. cerevisiae</i>	Dominios presentes en otras levaduras							
		<i>C. glabrata</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>K. lactis</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Y. lipolytica</i>
Ste2p	Ste 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ste3p	Ste 3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Gpa1p	G-alpha	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ste4p	WD40 (5)	✓	✓	(6)	(6)	(7)	✓	(6)	(6)
Ste18p	G-gamma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ste5p	Ste 5 Ste5_C	Sin Ste 5	Sin Ste 5	Sin Ste 5	Sin Ste 5	Sin dominios			
Bem1p	SH3_1 (2) PX PB1	SH3_1 (1) SH3_2 (1)	✓	✓	✓	Sin PB1	Sin PB1	Sin PB1	✓
Cdc24p	CDC24 RoGEF PH_10 PB1	Sin PB1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cdc42p	Ras	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bni1p	Drf_GBD Drf_FH3 FH2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ste20p	Pkinasa PBD	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ste11p	Pkinasa Ras bdg_2 SAM 2	SAM 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	SAM 1

Tabla 6: Continuación

Ste50p	Ste50p_SAM RA	✓	✓	✓	✓	SAM 2 por Ste50pSAM	SAM 2 por Ste50pSAM	SAM 2 por Ste50pSAM	SAM 1 por Ste50pSAM	
Ste7p	Pkinasa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Fus3p	Pkinasa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Kss1p	Pkinasa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Msg5p	DSPc	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Ste12p	Ste	✓	----	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Dig1p	Sin dominios									
Dig2p	Sin dominios									
Far1p	Sin dominios									
Fus1p	Sin dominios	SH3_2	Sin dominios				SH3_1	SH3_1	Sin dominios	
Los números entre paréntesis indican la cantidad de copias encontradas para los dominios repetidos										

En la tabla anterior podemos notar que es justamente en las proteínas multidominio donde se observa la mayor diferencia entre especies. Por ejemplo, en la proteína Ste4p de *S. cerevisiae* se identificaron cinco copias del dominio WD40, mientras que en *K. lactis*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *Y lipolytica* y *D. hansenii* se encontraron seis, e incluso siete copias de dicho dominio.

Una diferencia más notoria se presenta en Ste5p, donde la escasa similitud en las secuencias no permite establecer la presencia de dominios conservados en la mitad de las especies analizadas, mientras que la otra mitad sólo cuenta con uno de los dos dominios encontrados en *S. cerevisiae*. Es probable que la ausencia de uno o ambos dominios afecte la función de las proteínas homólogas. Sin embargo, no podemos asegurar que dicha diferencia tenga un efecto negativo en la señalización de la feromona y en la reproducción sexual ya que *D. hansenii* se encuentra entre las especies cuya proteína no tiene ningún dominio funcional. Lo mismo ocurre con *C. albicans* la cual, a pesar de las diferencias observadas en su proteína CaSte5p, ha demostrado ser capaz de aparearse sexualmente bajo ciertas circunstancias<sup>59, 60</sup>.

Otra proteína multidominio donde se observan diferencias marcadas es Bem1p, ya que *D. hansenii*, *C. albicans* y *C. tropicalis* no poseen el dominio PB1. Este dominio también se encuentra en la proteína Cdc24p y es importante para la formación del complejo Bem1p-Cdc24P, el cual establece la polarización de la célula<sup>61</sup>. Aunque la proteína homóloga de *C. glabrata* CgBem1p sí contiene el dominio PB1, es posible que la formación del complejo CgBem1p-CgCdc24p también se vea afectada ya que su proteína CgCdc24p es la única en la que dicho dominio no está presente.

Finalmente, aunque la base de datos utilizada no reportó la presencia de dominios funcionales para la proteína Fus1p de *S. cerevisiae*, las proteínas homólogas de *C. glabrata*, *C. albicans* y *C. tropicalis* poseen el dominio SH3. Entre las funciones de este dominio se encuentran dirigir la unión y localización de complejos proteicos involucrados en procesos celulares clave, además de desempeñar papeles regulatorios<sup>62</sup>. La ausencia de este dominio en *S. cerevisiae* parece indicar que no es

indispensable para la señalización de la feromona. Empero, no podemos descartar la importancia de esta diferencia ya que el análisis de secuencias también señala a esta proteína como posible implicada de la señalización diferencial por parte de *C. glabrata*.

### **7.4.3 Perfil filogenético**

Finalmente, se realizó un perfil filogenético de los genes que forman parte de la vía de señalización de la feromona en *S. cerevisiae*. Este análisis tenía como fin determinar si este conjunto de genes se encuentran conservados en otras especies y, a partir de su distribución y conservación, inferir la importancia de las proteínas codificadas por ellos para el apareamiento sexual en otros eucariotas.

El perfil de un gen es un patrón que muestra la presencia o ausencia de sus homólogos a través de una serie de genomas, reflejando su distribución taxonómica<sup>48</sup>. Esta herramienta se basa en el hecho de que, durante la evolución de una especie, sus genes pueden sufrir deleciones, duplicaciones o ser transferidos de una especie a otra. Si existe algún grupo de genes que tiendan a transferirse juntos a otros organismos, es posible que los productos de estos genes tengan funciones similares o que actúen en conjunto durante algún proceso biológico<sup>63, 64</sup>.

Basándonos en lo anterior, podemos suponer que la ausencia o divergencia de alguno de los genes que trabajan juntos, disminuirán la capacidad del organismo para llevar a cabo dicha función. Por lo tanto, el perfil filogenético también nos ayudaría a deducir cuáles genes han sufrido un mayor cambio y podrían ser la causa de la supuesta falta de un apareamiento sexual por parte de *C. glabrata*.

La figura 28 muestra el perfil obtenido mediante la herramienta PhyloPro la cual realiza la búsqueda de genes a través de 120 organismos eucariotas organizados según la siguiente clasificación taxonómica: plantas (7), protozoarios (30), hongos (26), metazoarios (2), nematodos (7), artrópodos (17), cordados (2), mamíferos (24) y otros vertebrados (7).

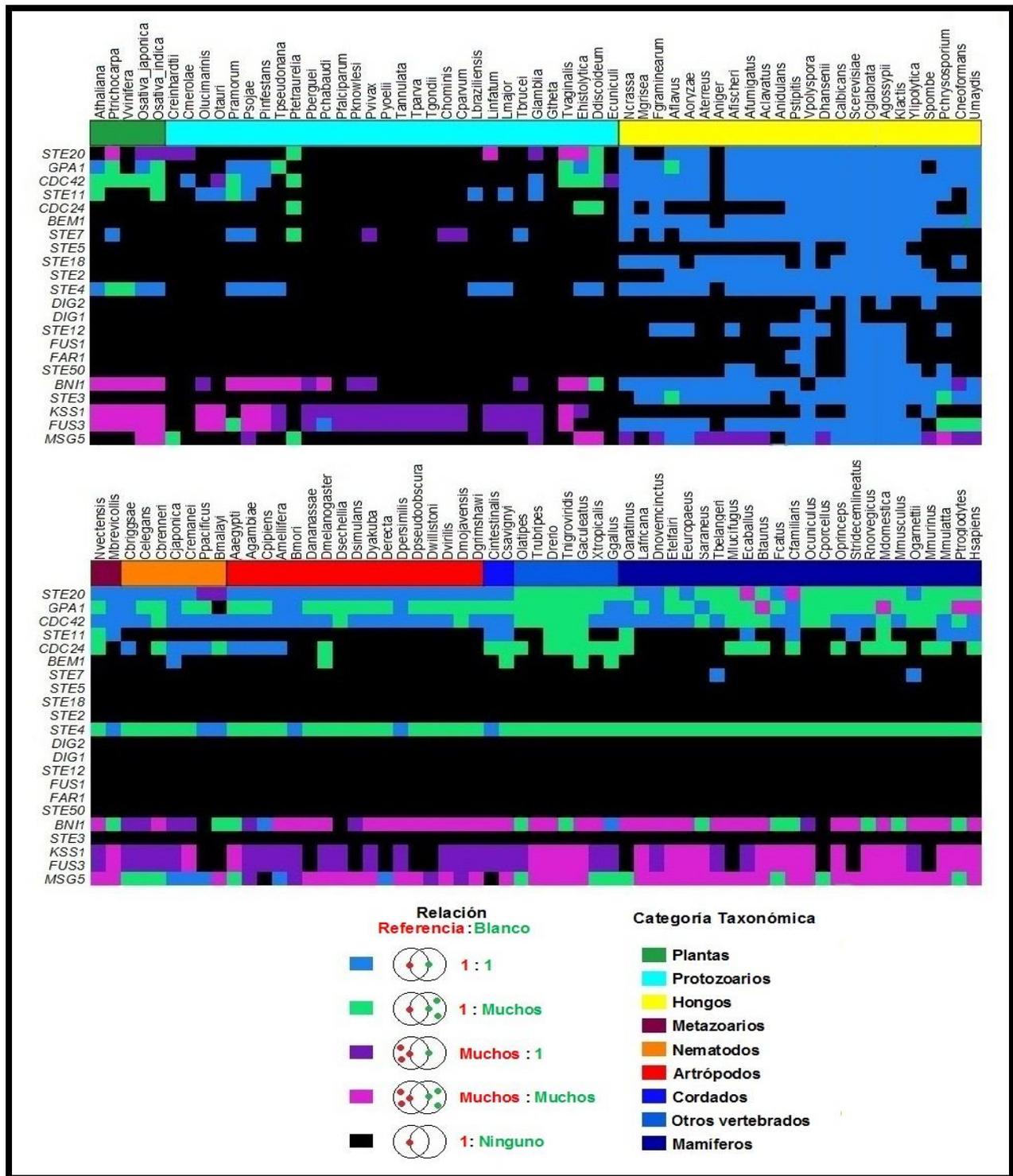


Fig. 28. Perfil filogenético de los genes involucrados en la vía de la feromona en *S. cerevisiae*. La búsqueda de homólogos se realizó en 120 especies de organismos eucariotas de diversa clasificación taxonómica. La mayoría de los genes cuenta con un solo homólogo distribuido exclusivamente en hongos. Sin embargo, existen otros genes que tienen muy buena conservación entre los eucariotas. Tal es el caso de *STE20*, *GPA1*, *CDC42*, *STE4*, *BNI1*, *FUS3*, *KSS1* y *MSG5*, cuya importancia para la célula los lleva a poseer incluso más de un homólogo. Por el contrario, *STE5*, *DIG1*, *DIG2*, *STE12*, *FUS1*, *FAR1* y *STE50* presentan muy poca conservación.

En la imagen se puede identificar un grupo de genes (*STE20*, *GPA1*, *CDC42*, *STE4*, *BNI1*, *FUS3*, *KSS1* y *MSG5*) que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos usados para la búsqueda. Los productos de estos genes son proteínas que desempeñan funciones importantes en las células como la traducción de señales (Gpa1p y Ste4p), mantenimiento y control de la morfogénesis celular (Cdc42p), polimerización de los filamentos de actina (Bni1p), la fosforilación (Ste20p, Fus3p y Kss1p) y la defosforilación (Msg5p), por lo que la importancia de su distribución es evidente.

Un aspecto a resaltar en esta imagen es que los genes involucrados en la señalización de la feromona se encuentran distribuidos principalmente en el reino *Fungi*. Sin embargo, hay genes (*STE5*, *DIG1*, *DIG2*, *STE12*, *FUS1*, *FAR1* y *STE50*) que cuentan con muy pocos homólogos entre los hongos y que carecen por completo de homólogos en otros organismos eucariotas. Estos resultados son consistentes con las observaciones anteriores que muestran que las proteínas codificadas por estos genes presentan mayores diferencias entre sí.

Lo anterior sugiere que estos componentes han evolucionado de forma distinta en cada especie y/o que han sufrido cambios adaptativos de acuerdo a las necesidades específicas del organismo, es decir, son genes divergentes. Es posible que las especies en las que no se detectó un homólogo para este conjunto de genes cuenten con una copia muy divergente del gen ya que, mientras más cambios acumule un gen o su proteína, más difícil será detectar su presencia en otros organismos. Otra explicación posible es que estas especies nunca hayan tenido un gen homólogo, o bien, que tengan otros que desempeñen la misma función. Sin embargo, es necesario realizar análisis más detallados y específicos para comprobar lo anterior.

En el caso de *STE2* y *STE3*, sus homólogos se encuentran presentes únicamente en hongos, lo que concuerda con la especificidad de su función. Este resultado aporta mayor peso al papel desempeñado por los receptores Ste2p y Ste3p, sugiriendo que las

diferencias en las secuencias, estructura y/o funciones de estas proteínas son clave para el apareamiento sexual.

Por último, cabe señalar que *STE18* es el gen que tiene el perfil más parecido al de *STE2*, es decir, mantienen un patrón de conservación similar debido a que las proteínas codificadas por estos genes interactúan para desempeñar una función común. Este hecho no es de sorprender ya que la subunidad  $G\beta\gamma$ , formada por Ste4p y Ste18p, regula positivamente la unión de la subunidad  $G\alpha$  con el receptor Ste2p y transmite la señal generada por el receptor y la feromona<sup>25</sup>. Sin embargo, se ha probado que la importancia de Ste18p para la señalización de la feromona varía dependiendo de la especie<sup>65</sup>. Esto sugiere que la interacción Ste2p-Ste18p es específica para cada levadura y que este aspecto debe ser considerado al realizar la expresión heteróloga del receptor.

## 8. DISCUSIÓN

La aparente falta de un apareamiento sexual en *C. glabrata*, a pesar de contar con la gran mayoría de los genes necesarios para que este se lleve a cabo, sugiere que los componentes de la vía de señalización de la feromona están desempeñando una función distinta a la observada en *S. cerevisiae* y en otras levaduras sexuales. Debido a que la activación de esta ruta está mediada por la unión de la feromona y su respectivo receptor, en este trabajo se aborda la posibilidad de que sea en estos dos componentes donde se encuentre la sutil diferencia que origine la señalización diferencial de la feromona por parte de *C. glabrata*.

La estrecha relación evolutiva entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* nos permitió establecer una estrategia sencilla para tratar de comprobar o descartar dicha teoría. Partiendo del hecho de que *C. glabrata* posee un gen que codifica para el receptor de la feromona  $\alpha$  (*CgSTE2*) y de que la vía de reconocimiento de la feromona está ampliamente estudiada en *S. cerevisiae*, se decidió realizar la expresión heteróloga del receptor CgSte2p en esta última levadura para identificar la causa de la respuesta asexual de *C. glabrata*. Al contar con todos los elementos adecuados para llevar a cabo el apareamiento sexual presentes en *S. cerevisiae*, la respuesta ante el estímulo de la feromona dependería exclusivamente del receptor de *C. glabrata*. En este caso, logramos expresar una mutante del receptor de *C. glabrata* cuyas mutaciones se generaron durante la amplificación del gen *CgSTE2*.

Tras el contacto con la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, las células que expresan el receptor Cgste2p no son arrestadas en la fase G1 pero sí presentan un cambio en su morfología. Las células muestran elongaciones tipo *shmoo*, aunque más alargadas y menos definidas que las presentes en la cepa silvestre. Si bien estos dos procesos se encuentran ligados, se ha reportado que las cepas mutantes *fus3* son capaces de

presentar células con *shmoo* aun si el arresto en G1 es nulo o deficiente<sup>37, 66</sup>. De ser así, las células en las que se expresa el receptor Cgste2p se estarían comportando como mutantes *fus3*, posiblemente como consecuencia de una señalización “parcial” de la feromona.

Esta supuesta señalización parcial podría estarse generando debido a que la concentración utilizada de feromona  $\alpha$  no fue la adecuada para inducir por completo la vía de señalización. Se ha descrito que la activación de Fus3p inducida por feromona es dosis dependiente por lo que, mientras más activa se encuentre Fus3p, será capaz de interactuar con mayor número de efectores<sup>66</sup>. Es decir, las respuestas celulares típicas en las que es necesaria la intervención de Fus3p se generarán dependiendo de la concentración de feromona. De este modo, es necesaria una menor concentración de feromona para generar el arresto de las células en G1 pero se requiere mayor concentración de la misma para que las células presenten las elongaciones *shmoo*<sup>66</sup>.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo plantean un caso contrario para la señalización mediada por Cgste2p en el que la generación de *shmoo* es posible aun en ausencia de arresto en G1. En este caso podemos suponer que, al no contar con una proteína Fus3p totalmente activa, Kss1p es la encargada de generar el *shmoo* ya que se ha visto que esta proteína es capaz de rescatar el fenotipo *shmoo* en cepas  $\Delta fus3$  además de ser necesaria para optimizar la formación de estas elongaciones<sup>66, 67</sup>. No obstante, la implicación de Kss1p en los resultados obtenidos conlleva a la posibilidad de que las elongaciones observadas al microscopio no correspondan a células *shmoo* sino al fenotipo de crecimiento invasivo, el cual se ha reportado que puede presentarse cuando Kss1p es activada de forma preferencial debido a una sobreexpresión de Ste7p<sup>68</sup>. Este hecho plantea una nueva variable que deberá ser analizada mediante experimentos más específicos.

Otra posible explicación para la falta del arresto celular recae directamente sobre el receptor Cgste2p y sus diferencias con el receptor silvestre de *S. cerevisiae*. Se ha reportado que los residuos 45 (valina), 46 (asparagina), 50 (treonina) y 52 (alanina) del

receptor Ste2p son necesarios para que las células arresten su crecimiento en G1<sup>24</sup>. Al analizar con detalle el alineamiento entre estos dos receptores mostrado en la figura 6, se observa que el receptor de *C. glabrata* tiene residuos de lisina y arginina en las posiciones alineadas con los residuos 46 y 50 de Ste2p. Las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos presentes en *C. glabrata* son muy distintas a las de los aminoácidos presentes en el receptor de *S. cerevisiae*, lo que podría afectar de manera considerable la actividad del receptor y el arresto del ciclo celular. En relación con lo anterior, no debemos olvidar que el receptor de *C. glabrata* expresado en *S. cerevisiae* es un receptor mutante. Aunque ya se haya analizado la posibilidad de que estas mutaciones no repercutan en los resultados, no podemos descartar por completo su implicación.

Por otro lado, el receptor Cgste2p mostró mayor afinidad a la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* ya que su unión provoca el arresto de las células en la fase G1, además de alterar ligeramente la morfología celular con elongaciones tipo *shmoo*. Este resultado sugiere que la unión feromona-receptor es específica para cada especie, además de apoyar la idea de que la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* no fue suficiente (ya sea por concentración o por compatibilidad) para activar completamente la vía.

Hasta este punto, podemos suponer que el par feromona-receptor de *C. glabrata* está desempeñando una función similar a la del par homólogo en *S. cerevisiae* ya que la vía de la feromona está siendo activada, llevando al arresto celular y a la generación de un fenotipo tipo *shmoo*. Sin embargo, esta activación no conduce al apareamiento sexual puesto que, ni la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae* ni la de *C. glabrata*, indujeron la formación de las células diploides en las condiciones ensayadas.

Partiendo del hecho de que, tanto el arresto de las células en G1 como la polarización y las elongaciones *shmoo* son necesarios para que las células puedan fusionarse, entonces es posible que la falta de apareamiento se deba a que la morfología observada no se trate de *shmoos* verdaderos. Si este es el caso, no basta con atribuir la señalización “parcial” a la feromona y su compatibilidad con el receptor sino que es necesario considerar otras interacciones necesarias para la activación de la vía.

Tal es el caso del dímero  $G\beta\gamma$  de la proteína G, el cual se encarga de transmitir la señal generada por el par feromona-receptor a través de los efectores correspondientes<sup>27</sup>. Se sabe que una de las primeras funciones realizadas por el dímero  $G\beta\gamma$ , tras su disociación de  $G\alpha$ , es la de reclutar a la proteína de andamiaje Ste5p y localizarla en la membrana plasmática<sup>69</sup>. Desde esta posición, Ste5p favorece la transmisión de la señal mediante la activación de la cascada de las MAP cinasas (Ste11p, Ste7p, Fus3p y Kss1p) además de aumentar la fidelidad de la señal<sup>69-71</sup>. Para que la localización de Ste5p se lleve a cabo es necesario que dicha proteína se una a la subunidad  $G\beta$  (Ste4p) y que el dímero  $G\beta\gamma$  se encuentre anclado a la membrana mediante la subunidad  $G\gamma$  (Ste18p)<sup>72, 73</sup>.

Por su parte, la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G también desempeña un papel importante en la señalización de la feromona. Mientras que en *S. cerevisiae* actúa como regulador negativo al desensibilizar la respuesta a la feromona<sup>25, 74, 75</sup>, en otras levaduras puede llevar a cabo una función distinta. Por ejemplo, en *K. lactis* la subunidad  $G\alpha$  regula positivamente la respuesta a la feromona a través de Ste50p<sup>76</sup>, mientras que en *Schizosaccharomyces pombe* esta subunidad es la única encargada de regular la señalización ya que el dímero  $G\beta\gamma$  no participa en este proceso<sup>77, 78</sup>.

Ya que los resultados obtenidos hasta este momento sugieren que la vía está siendo activada de manera diferencial por Cgste2p, es posible que la proteína G o alguna de sus subunidades no estén comportándose de la manera esperada. Existen dos razones por las cuales podemos suponer que la interacción entre la proteína G y el receptor Cgste2p no está permitiendo que se lleve a cabo el apareamiento de las células: 1) tal como se observó en el perfil de los genes implicados en la vía (figura 28), *STE2* y *STE18* presentan un patrón de conservación similar, sugiriendo que la interacción entre estos genes y sus respectivos productos es muy específica y necesaria para desempeñar su función. En ese caso, es posible que el receptor Cgste2p no sea compatible con la subunidad  $G\gamma$  de *S. cerevisiae* y que, al igual que como ocurrió con la feromona, se requiera de la proteína G presente en *C. glabrata* para obtener una mejor

respuesta; 2) se sabe que el extremo carboxilo del receptor Ste2p está implicado en la activación de la proteína G<sup>21-23</sup>. Tal como se observa en la figura 6, la región que más difiere entre los receptores de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* es justamente el extremo carboxilo terminal. Por lo tanto, es posible que estas diferencias en los receptores no permitan que la proteína G sea activada de la misma forma que sucede en *S. cerevisiae* y, por ende, no se esté llevando a cabo la activación de los demás componentes de la vía.

Con base en estos resultados, podemos suponer que la falta de un ciclo sexual en *C. glabrata* no depende exclusivamente del receptor y su unión a la feromona, sino que también los demás componentes de la vía tienen un papel importante. Pero, ¿cuál o cuáles componentes son determinantes para que se lleve a cabo el apareamiento sexual? El perfil filogenético de los genes implicados en la vía indica que estos se encuentran conservados principalmente en el reino *Fungi*. Sin embargo, dentro de los mismos hongos, se observa una diferencia en el patrón de conservación. Los genes *STE5*, *DIG1*, *DIG2*, *STE12*, *FUS1*, *FAR1* y *STE50* parecen ser los más divergentes ya que se encuentran ausentes en la mayoría de los organismos contemplados para el perfil. Esta divergencia se aprecia con mayor claridad al comparar las proteínas codificadas por dichos genes ya que, además de su poca conservación, las proteínas homólogas presentes en algunas levaduras difieren considerablemente de las proteínas de *S. cerevisiae*, tanto en secuencia como en dominios funcionales.

Entre las diferencias encontradas en las proteínas cabe destacar los casos de Far1p, Fus1p y Ste5p. Estas proteínas no sólo presentan los porcentajes de identidad más bajos dentro de las levaduras analizadas, sino que también se observa una gran diferencia en el contenido de dominios funcionales. Las tres proteínas desempeñan funciones de gran importancia para el apareamiento sexual, por lo que estas diferencias pueden ser clave para entender el comportamiento asexual de *C. glabrata*.

Far1p favorece el arresto de las células en la fase G1 al bloquear la función del complejo Cln1p/2p-Cdc28p<sup>33, 34</sup>, además de modular la polaridad y morfogénesis de las

células tras formar el complejo  $G\beta\gamma$ -Far1p-Cdc24p<sup>27, 79, 80</sup>. La falta de actividad de esta proteína impediría el arresto del ciclo celular y los cambios morfológicos en las células, lo que afectaría en gran medida la capacidad de las células para reproducirse sexualmente.

Por su parte, Fus1p está directamente relacionada con el apareamiento de las células ya que se localiza en el extremo de las elongaciones *shmoo* y es necesaria para la fusión celular<sup>81, 82</sup>. Aunque CgFus1p cuenta con un dominio funcional que le permita desempeñar sus funciones, el porcentaje de identidad obtenido por esta proteína pone en duda que dicha función sea la misma que lleva a cabo su homóloga en *S. cerevisiae*.

Finalmente, la proteína de andamiaje Ste5p, cuya implicación en la activación de la cascada de las MAP cinasas ya se ha mencionado anteriormente, plantea un caso interesante en el que la mitad de las especies analizadas no poseen ninguno de los dominios reportados en la herramienta Pfam, mientras que la otra mitad sólo presenta uno de los dominios. De los dos dominios descritos para esta proteína, se sabe que el dominio Ste5 facilita la autofosforilación de Fus3p, la cual, una vez activada, promueve la fosforilación de Ste5p llevando a una disminución en la transcripción de los genes inducida por feromona<sup>83</sup>. Por lo tanto, este dominio no promueve la señalización sino que actúa como un regulador negativo de la misma, de tal manera que la falta de este dominio en *C. glabrata* no estaría repercutiendo en el apareamiento sexual. Por su parte, el dominio Ste5\_C cataliza la fosforilación de Fus3p por la proteína cinasa Ste7p, convirtiéndolo en un dominio de mayor relevancia para la generación de las respuestas celulares típicas inducidas por feromona<sup>84</sup>. Si bien la proteína CgSte5p de *C. glabrata* cuenta con este dominio en su secuencia, no podemos garantizar que realiza las mismas funciones que la proteína de *S. cerevisiae* ya que su porcentaje de identidad es bajo.

Como ya se ha mencionado, la presencia de genes homólogos necesarios para el apareamiento y reproducción sexual no asegura que las células puedan reproducirse de esta forma. Incluso, la similitud de las proteínas codificadas por dichos genes no

garantiza que su interacción con el resto de los componentes de la vía se realice de la misma manera que como sucede en *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en *K. lactis* el receptor K1Ste2p no se une a la feromona  $\alpha$  como sucede en otras levaduras sino que es el encargado de reconocer a la feromona **a**, mientras que K1Ste3p es el receptor para la feromona  $\alpha$ <sup>85, 86</sup>. La unión de la feromona a su respectivo receptor activa las subunidades G $\alpha$  y G $\beta$  de la proteína G, las cuales se encargan de transmitir la señal a través de dos rutas que convergen en el factor de transcripción K1Ste12p para, finalmente, inducir la expresión de los genes requeridos para el apareamiento de las células haploides de *K. lactis*<sup>86</sup>. Casos como este nos llevan a pensar la vía de la señalización de la feromona puede ser tan compleja que, aun entre los organismos que poseen un ciclo sexual, es difícil realizar predicciones sobre su comportamiento.

Aunque algunos estudios sugieren que el análisis y comparación de secuencias no es suficiente para predecir la similitud de funciones de las proteínas ni para determinar si una especie es capaz de completar un ciclo sexual<sup>60</sup>, los análisis realizados en este trabajo nos permiten identificar genes divergentes que podrían estar involucrados en la falta de una respuesta sexual en *C. glabrata*. No obstante, es necesario profundizar en el estudio de estos genes divergentes y de sus proteínas para establecer con mayor claridad y certeza cuál es su implicación en el comportamiento asexual de esta levadura. Ante todo, no podemos descartar la posibilidad de que el carácter asexual de *C. glabrata* se encuentre determinado por la expresión y organización de sus genes (por ejemplo, los genes del locus MTL<sup>87</sup>), sin que la similitud de sus proteínas con respecto a *S. cerevisiae* sea de gran importancia.

Los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo sugieren que, a pesar de que el par feromona-receptor de *C. glabrata* no desempeña exactamente la misma función que sus homólogos en *S. cerevisiae*, la unión de estos componentes permite, hasta cierto grado, inducir las respuestas típicas observadas en esta última levadura. Esto mismo se ha observado en las proteínas CgSte11p<sup>88</sup>, CgSte12p<sup>89</sup> y CgSte20p<sup>90</sup> las cuales son capaces de complementar los defectos de apareamiento de las cepas mutantes  $\Delta ste11$ ,  $\Delta ste12$  y  $\Delta ste20$  de *S. cerevisiae* respectivamente, aun cuando sus

funciones no son exactamente las mismas que las de sus homólogas. Por lo tanto, la presencia y conservación de los componentes de la vía de señalización de la feromona en *C. glabrata* plantean la importancia de estas proteínas para la levadura, ya sea mediante un ciclo sexual aún no descubierto o como componentes necesarios para la adaptación y/o patogenicidad de las células.

## 9. CONCLUSIONES

Durante este trabajo se logró la expresión heteróloga de una mutante del receptor CgSte2p en una cepa de *S. cerevisiae*  $\Delta$ ste2 Mata.

El receptor Cgste2p fue capaz de reconocer y unirse a la feromona  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. Tras su unión, las células adquieren una morfología similar al *shmoo*. Sin embargo, no se observa ni el arresto del ciclo celular ni el apareamiento sexual inducido por feromona.

El receptor Cgste2p muestra mayor afinidad con la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata* ya que su unión genera el arresto del ciclo celular incluso a bajas concentraciones de feromona. Las células también presentan elongaciones tipo *shmoo*, pero no se lleva a cabo el apareamiento sexual.

La comparación de los demás componentes de la vía de señalización de la feromona de *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, y algunas otras levaduras sexuales y asexuales no muestra una tendencia marcada que pueda ser asociada con la respuesta diferencial de las células a la feromona.

Se logró identificar un conjunto de proteínas que difieren considerablemente de sus homólogas en *S. cerevisiae*. Dentro de estas, se destacan las diferencias observadas en Ste5p, Far1p y Fus1p debido a su importancia para el apareamiento sexual.

## 10. PERSPECTIVAS

Durante este trabajo se dio pie a una serie de análisis y discusiones que permiten explicar los resultados obtenidos. Si bien estas discusiones fueron fundamentadas en datos obtenidos y reportados por otros estudios en este tema, sería conveniente plantear una nueva metodología que permita obtener resultados más concluyentes.

En primer lugar, es necesario lograr la expresión del receptor silvestre de *C. glabrata* para evitar la presencia de mutaciones que puedan influir en los resultados. Asimismo, podría realizarse una curva concentración-respuesta de las feromonas  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* para determinar la concentración necesaria de ambas feromonas para activar al receptor CgSte2p y al resto de la vía de señalización. Con esto, se descarta la posibilidad de que la feromona actúe como un factor limitante en la respuesta.

Para confirmar la presencia de elongaciones *shmoo* inducidas por feromona es necesario utilizar marcadores de *shmoo*. Una opción consiste en utilizar un marcador de fluorescencia como GFP unido a la proteína Fus1p, la cual se expresa en respuesta a la feromona y se localiza en la punta de las elongaciones para favorecer la fusión celular. Este experimento permitirá confirmar la total activación de la vía por el par feromona-receptor además de comprobar la presencia de un *shmoo* verdadero, ya que, en caso de tenerlo, se observara fluorescencia en sus puntas.

Igualmente sería oportuno establecer una metodología complementaria para observar el apareamiento celular en la cual se establezcan las condiciones óptimas de temperatura y tiempo para que este se lleve a cabo. En el caso del apareamiento inducido por la feromona  $\alpha$  de *C. glabrata*, es necesario probar más tiempos de

incubación previa con la feromona, o bien, realizar un experimento en medio líquido donde la feromona se encuentre presente durante todo el proceso.

Otro aspecto a considerar es la relevancia de la afinidad entre el receptor CgSte2p y la proteína G para la señalización de la feromona. Retomando la importancia del extremo carboxilo terminal para la unión del receptor a la proteína G, resultaría interesante observar la respuesta obtenida al intercambiar este extremo entre los receptores de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*. La construcción de un receptor CgSte2p híbrido que contenga el extremo carboxilo terminal de *S. cerevisiae* nos permitirá comprobar la importancia de este extremo para la señalización y la implicación del mismo en el comportamiento asexual de *C. glabrata*.

Del mismo modo, los resultados obtenidos en el análisis de las proteínas de la vía nos llevan a querer determinar la implicación de CgSte5p, CgFar1p y CgFus1p en la falta de apareamiento sexual en *C. glabrata*. Para ello, la estrategia planteada para CgSte2p podría ser de utilidad. La expresión heteróloga de estas proteínas en *S. cerevisiae*, ya sea individualmente o en combinación con el receptor CgSte2p, arrojarán una pista sobre su papel en el ciclo sexual de *C. glabrata*.

Además, es preciso realizar un análisis más detallado de las proteínas que forman parte de la vía de señalización en *C. glabrata*. Comparar no sólo los dominios existentes sino también la secuencia de cada dominio ayudará para establecer regiones específicas de las proteínas que han sufrido cambios importantes y determinantes para el comportamiento sexual de esta levadura.

## 11. ANEXOS

### A. Soluciones

- *Amortiguador de extracción A.* Agregar los siguientes compuestos a un recipiente con 50 mL de agua desionizada (la concentración final se escribe en negrita):
  - 2.5 mL de Tris-Cl 2M (**50mM**)
  - 2 mL de EDTA 0.5M (**10mM**)
  - 3 mL de NaCl 5M (**150mM**)
  - 1 ml de Triton X-100 (**1%**)
  - 10 mL de SDS 10% (**1%**)Agitar hasta homogenizar la solución. Agregar el volumen de agua necesario para completar 100 mL de amortiguador.
- *Amortiguador TE 10X.* Añadir los siguientes compuestos a un recipiente con 50 mL de agua desionizada:
  - 1.21 g de Tris base (**100mM**)
  - 2 mL de EDTA 0.5M (**10mM**)Agitar hasta que se disuelvan los compuestos. Ajustar el pH a 7.5 con ácido clorhídrico concentrado (HCl). Agregar el volumen de agua desionizada necesaria para completar 100 mL de amortiguador.
- *Amortiguador TER.* Preparar 10 mL justo antes de utilizarse. Mezclar los siguientes compuestos por agitación:
  - 10 mL de amortiguador TE 10X (**99.9%**)
  - 10  $\mu$ L de coctel de RNAasa (**0.1%**)

- *Amortiguador KCM para transformación de bacterias.* Prepara 100 mL de amortiguador a partir de los siguientes compuestos:
  - 10 mL de KCl 1M (**100mM**)
  - 3 mL de CaCl<sub>2</sub> 1M (**30mM**)
  - 5 mL de MgCl<sub>2</sub> 1M (**50mM**)
  - 82 mL de agua desionizadaAgitar hasta homogenizar. Esterilizar por filtración. Alicuotar en tubos de polipropileno y almacenar a -20°C.
- *Amortiguador de Lisis para bacterias.* Agregar los siguientes componentes a un recipiente con 50 mL de agua desionizada:
  - 10 mL de Triton X-100 10% (**1%**)
  - 2 mL de Tris-Cl 1M (**20mM**)
  - 0.5 mL de EDTA 0.5M (**2.5mM**)Agitar para homogenizar la solución. Agregar el volumen de agua faltante para completar 100 mL de amortiguador. Esterilizar por autoclave.
- *Amortiguador TAE 50X.* Agregar, a un recipiente que contenga 300 mL de agua desionizada, los siguientes compuestos:
  - 242.0 g de tris base (**2M**)
  - 57.1 mL de ácido acético glacial
  - 100 mL de EDTA 0.5M (**50mM**)Agitar. Añadir el volumen de agua necesario para completar un litro de amortiguador.
- *Solución TE/LiOAc.* Mezclar las siguientes soluciones:
  - 1 mL de amortiguador TE 10X (**1X**)
  - 1 mL de acetato de litio (LiOAc) 1M (**100mM**)
  - 8 mL de agua desionizadaEsterilizar por filtración. Preparar unos minutos antes de su utilización

- *Solución PEG/LiOAc/TE.* Mezclar los siguientes compuestos:
  - 1 mL de amortiguador TE 10X (**1X**)
  - 1 mL de acetato de litio (LiOAc) 1M (**100mM**)
  - 8 mL de polietilenglicol-4000 (PEG) 50% (**40%**)Esterilizar por filtración. Preparar unos minutos antes de su utilización
  
- *Solución de agua con DEPC.* Preparar 100 mL de solución al mezclar lo siguiente:
  - 100  $\mu$ L de DEPC (Dietilpirocarbonato) (**0.1%**)
  - 100 mL de agua desionizada (**99.9%**)Agitar durante toda la noche para que se mezcle bien e inactive por completo las RNAsas. Esterilizar por autoclave antes de usar.
  
- *Amortiguador de lisis para extraer RNA.* Agregar las siguientes soluciones a un recipiente con 5 mL de agua desionizada:
  - 1 mL de acetato de sodio 1M pH 5.2 (**100mM**)
  - 50  $\mu$ L de  $MgCl_2$  1M (**5mM**)Agitar para homogenizar la solución. Agregar el volumen de agua faltante para completar 10 mL de amortiguador. Esterilizar por filtración.
  
- *Solución RFC.* Para prepara 10 mL de solución, mezclar las siguientes soluciones:
  - 5 mL de fenol pH 4.5 (**50%**)
  - 4.8 mL de cloroformo (**48%**)
  - 200  $\mu$ L de alcohol isoamílico (**2%**)Trabajar en una campana de extracción. Agitar hasta que la mezcla sea homogénea. La solución debe prepararse minutos antes de utilizarse.
  
- *Amortiguador MAE 10X.* Mezclar los siguientes compuestos:
  - 20 mL de MOPS 2M (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) (**200mM**)
  - 10 mL de acetato de sodio 1M (**50mM**)
  - 4 mL de EDTA 0.5M (**10mM**)

Mezclar por agitación. Ajustar el pH a 7 con NaOH y agregar el volumen de agua faltante para completar 200 mL de amortiguador. Esterilizar por filtración. Guardar en refrigeración protegido de la luz.

- *Amortiguador de RNA 1.25X*. Para preparar 4 mL de amortiguador, mezclar:  
2.2 mL de formamida desionizada (**55%**)  
0.8 mL de formaldehído (**20%**)  
0.5 mL de MAE 10X (**1.25X**)  
0.4 mL de glicerol al 80% (**2%**)  
100  $\mu$ L de azul de bromofenol al 2% (**0.05%**)  
Agitar hasta que la mezcla sea homogénea. Guardar en congelación.

## **B. Medios de cultivo**

### **B.1 Bacterias**

- *LB (Luria-Bertoni) líquido*. Mezclar los siguientes compuestos en un recipiente que contenga 50 mL de agua:  
1 g de Bacto triptona  
0.5 g de extracto de levadura  
0.5 g de NaCl  
Agregar el volumen de agua desionizada necesario para completar 100 mL de medio. Esterilizar en autoclave. Almacenar a 4°C.
- *LB/ampicilina sólido*. Agregar 1.5 g de agar por cada 100 mL de medio LB líquido. Esterilizar por autoclave. Cuando el medio alcance una temperatura cercana a los 50°C, añadir ampicilina (50 mg/mL) para una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. Verter el medio en cajas Petri y esperar a que solidifique. Almacenar a 4°C.
- *LB/amp/IPTG/X-Gal sólido*. Preparar medio LB/ampicilina sólido. Una vez que el medio gelificó en las cajas, añadir lo siguiente:

12.6  $\mu$ L de IPTG 0.5M

2 mL de X-Gal 20 mg/mL

Distribuir en la superficie del medio con ayuda de una varilla de vidrio hasta que se absorban. Almacenar a 4°C.

- *SOC (Super optimal broth with catabolite repression)*. En un recipiente que contenga 100 mL de agua desionizada, añadir los siguientes componentes:

2 g de Bacto triptona

0.5 g de extracto de levadura

0.05 g de NaCl

1 mL de KCl 250mM

Mezclar por agitación. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5M y agregar el volumen de agua requerido para completar 100 mL de medio. Esterilizar por autoclave. Una vez estéril y frío, añadir lo siguiente:

0.5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2M

2 mL de glucosa 1M

## **B.2 Levaduras**

- *YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) líquido*. Agregar los siguientes componentes a un recipiente que contenga 50 mL de agua desionizada:

1 g de extracto de levadura

2 g de peptona

2 g de glucosa

Mezclar por agitación. Agregar el volumen de agua requerida para completar 100 mL de medio. Esterilizar por autoclave.

- *YPD sólido*. Agregar 1.5 g de agar por cada 100 mL de medio líquido. Esterilizar por autoclave. Cuando el medio alcance una temperatura de alrededor de 50°C, vaciar en cajas Petri. Cuando el medio esté sólido, almacenar a 4°C.

- *Medio mínimo SD (Synthetic Dropout)*. Mezclar en un recipiente los siguientes compuestos:

50 mL de agua desionizada

0.67 g de base de nitrógeno de levaduras (YNB)

2 g de glucosa 2%

2g de *Drop out* mix 0.2%

0.5 g de sulfato de amonio

Cuando la mezcla sea homogénea, agregar el volumen de agua faltante para completar 100 mL de medio. Esterilizar por autoclave.

**Nota:** El *Drop out* es una mezcla de aminoácidos en las cantidades señaladas en la tabla siguiente. En caso de requerir un medio de selección, se utiliza la mezcla *Drop out* que carezca del nutriente de selección.

Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
Adenina	0.5 g	Inositol	2 g
Ácido aspártico	2 g	Isoleucina	2 g
Ácido glutámico	2 g	Leucina	10 g
Ácido para-aminobenzoico	2 g	Lisina	2 g
Alanina	2 g	Metionina	2 g
Arginina	2 g	Prolina	2 g
Asparagina	2 g	Serina	2 g
Cisteína	2 g	Treonina	2 g
Fenilalanina	2 g	Triptófano	2 g
Glicerina	2 g	Tirosina	2 g
Glutamina	2 g	Uracilo	2 g
Histidina	2 g	Valina	2 g

## C. Protocolos

### C1. Extracción de DNA genómico

1. Crecer las cepas transformantes en 5 mL de medio YPD líquido contenido en tubos de vidrio grandes. Incubar a 30°C toda la noche.
2. Transferir a tubos de plástico y centrifugar a 3,500 rpm durante 5 minutos.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 500  $\mu$ L de amortiguador de extracción A (anexo A) usando el vortex.
4. Transferir a tubos de plástico de 2 mL con 500  $\mu$ L de fenol. Agitar vigorosamente por 4 minutos.
5. Incubar a 44°C durante 30 minutos.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. Tomar 450  $\mu$ L de la fase acuosa y transferirlos a un tubo limpio.
7. Centrifugar durante 3 minutos a 13,000 rpm.
8. Transferir por decantación a tubos que contengan amortiguador A sin detergente más 0.3  $\mu$ L de coctel de RNAasa. Agitar.
9. Incubar durante 30 minutos a 44°C.
10. Añadir 15  $\mu$ L de NaCl 5 M y 1 mL de etanol 100%. Mezclar suavemente.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos y desechar el sobrenadante.
12. Añadir 1 mL de etanol 70% y mezclar por inversión.
13. Centrifugar por un minuto a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
14. Centrifugar durante 30 segundos.
15. Extraer el etanol que haya quedado con ayuda de una pipeta, sin tocar el pellet.
16. Secar el botón dejando abierto el tubo durante 10 minutos cerca de un mechero.
17. Añadir 250  $\mu$ L de amortiguador TER (anexo A) e incubar durante 30 minutos a 37°C.
18. Almacenar el DNA a -20°C hasta su utilización.

**C2. Purificación de DNA plasmídico con el kit *QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN)***

1. Centrifugar el cultivo celular durante 3.5 minutos a 3,500 rpm.
2. Resuspender el botón de células bacterianas en 250  $\mu$ L de amortiguador P1 y transferir a un tubo de plástico de 1.5 mL.
3. Añadir 250  $\mu$ L de amortiguador P2 y mezclar por inversión de 4 a 6 veces.
4. Añadir 350  $\mu$ L de amortiguador N3 y mezclar inmediatamente por inversión.
5. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm.
6. Colocar el sobrenadante en una columna *QIAprep* cuidando de no tomar nada del botón.
7. Centrifugar durante 30-60 segundos. Desechar el sobrenadante.
8. Lavar la columna añadiendo 0.75 mL de amortiguador PE y centrifugando durante un minuto.
9. Desechar el sobrenadante. Centrifugar nuevamente por un minuto.
10. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL limpio.
11. Para eluir el DNA, añadir 50  $\mu$ L de amortiguador EB o agua estéril al centro de la membrana. Dejar reposar durante aproximadamente un minuto. Centrifugar durante un minuto a 13,000 rpm.
12. Guardar la muestra a -20°C hasta su uso.

**C3. Purificación de PCR con el kit *QIAquick PCR purification (QIAGEN)***

1. Añadir 5 volúmenes de amortiguador PBI a un volumen de muestra de PCR. Revisar que el color de la muestra sea amarillo.
2. Colocar la mezcla en una columna *QIAquick* contenida en un tubo colector de 2 mL.
3. Centrifugar durante 30-60 segundos a 13,000 rpm.
4. Desechar el sobrenadante y colocar nuevamente la columna en el tubo.
5. Añadir 0.75 mL de amortiguador PE a la columna y centrifugar a 13,000 rpm durante 30-60 segundos.
6. Desechar el sobrenadante. Centrifugar nuevamente por un minuto.
7. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL limpio.

8. Para eluir el DNA, añadir 50  $\mu$ L de amortiguador EB o agua estéril al centro de la membrana. Dejar reposar durante aproximadamente un minuto. Centrifugar durante un minuto a 13,000 rpm.
9. Guardar la muestra a -20°C hasta su uso.

#### **C4. Extracción de DNA en gel de agarosa con el kit *QIAquick Gel Extraction (QIAGEN)***

1. Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa con una espátula limpia.
2. Pesar el fragmento de gel y colocar en un tubo de plástico de 1.5 mL.
3. Añadir 3 volúmenes de amortiguador QG a un volumen de gel (100 mg ~ 100  $\mu$ L) e incubar a 50°C durante 10 minutos o hasta que se disuelva el gel completamente.
4. Añadir un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.
5. Coloca la muestra en una columna *QIAquick* contenida en un tubo colector y centrifuga durante un minuto a 13,000 rpm.
6. Desechar el sobrenadante y colocar de nuevo la columna en el tubo.
7. Añadir 0.75 mL de amortiguador PE a la columna y centrifugar durante un minuto.
8. Desechar el sobrenadante. Centrifugar nuevamente por un minuto.
9. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL limpio.
10. Para eluir el DNA, añadir 50  $\mu$ L de amortiguador EB o agua estéril al centro de la membrana. Dejar reposar durante aproximadamente un minuto. Centrifugar durante un minuto a 13,000 rpm.
11. Guardar la muestra a -20°C hasta su uso.

#### **C5. Transformación de células competentes de *Escherichia coli***

1. Colocar las células competentes en hielo para su descongelación.
2. Colocar en un tubo de plástico de 1.5 mL de 2 a 10  $\mu$ L de DNA procedente de la mezcla de ligación.
3. Añadir amortiguador KCM frío hasta completar 100  $\mu$ L.

4. Añadir 100  $\mu$ L de células competentes y mezclar por inversión.
5. Incubar en hielo durante 30 minutos.
6. Colocar la mezcla en un baño de agua a 42°C durante exactamente 2 minutos.  
Regresar los tubos al hielo.
7. Agregar 800 mL de medio SOC a temperatura ambiente.
8. Incubar durante 1.5 horas a 37°C con agitación constante.
9. Centrifugar las células a 3,500 rpm durante 3.5 minutos.
10. Resuspender el botón con 100  $\mu$ L de medio SOC.
11. Plaquear las células en cajas con el medio de cultivo adecuado.
12. Incubar a 37°C.

#### **C6. Transformación de células de levadura**

1. Inocular 10 mL de medio YPD con una asada de células de levadura. Incubar durante 24 horas a 30°C con agitación constante.
2. Inocular 50 mL de medio YPD con 1.5 mL del cultivo anterior e incubar a 30°C hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> entre 0.4 y 0.5.
3. Transferir 35 mL de cultivo a tubos de centrifuga estériles.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 2,500 rpm.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 mL de agua estéril.
6. Transferir a un tubo de plástico de 1.5 mL y centrifugar durante un minuto a 12,800 rpm.
7. Lavar las células con 1 mL de solución TE/LiOAc recién preparada (anexo A).
8. Centrifugar por un minuto a 12,800 rpm. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón con 350  $\mu$ L de solución TE/LiOAc (volumen 1/100 con respecto al volumen inicial del medio).
9. En un tubo limpio, mezclar 50  $\mu$ L de las células con 1  $\mu$ g de plásmido y 5  $\mu$ L de DNA de esperma de salmón recién hervido.
10. Añadir 300  $\mu$ L de solución PEG/Li/TE (anexo A) recién preparada y mezclar.
11. Agitar durante 30 minutos a 30°C.
12. Añadir 40 mL de DMSO 99.9 % (Dimetilsulfóxido) y mezclar con vortex.
13. Colocar la muestra en un baño de agua a 42°C durante 15 minutos.

14. Centrifugar durante un minuto a 12,800 rpm. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón con 400  $\mu$ L de agua estéril.
15. Plaquear la muestra en cajas con medio para levaduras.
16. Incubar a 30°C hasta que las colonias de levadura crezcan.

### **C7. Extracción de RNA total**

1. Inocular 5 mL del medio correspondiente con una asada de la cepa deseada. Incubar durante 24 horas con agitación constante.
2. Inocular 50 mL de medio con 1 mL del cultivo anterior e incubar hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.5 aproximadamente.
3. Transferir el cultivo a tubos de centrifuga estériles.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 2,500 rpm.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 mL de agua con DEPC (Dietilpirocarbonato) estéril.
6. Transferir a un tubo de plástico de 1.5 mL y centrifugar durante un minuto a 12,800 rpm.
7. Desechar el sobrenadante y resuspender las células con 470  $\mu$ L de amortiguador de lisis para extraer RNA.
8. Agregar rápidamente 25  $\mu$ L de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 20% estéril y 5  $\mu$ L de DEPC. Mezclar.
9. Agregar 500  $\mu$ L de solución RFC (anexo A) y agitar por vortex durante 1 minuto.
10. Colocar los tubos destapados en un baño de agua a 65°C durante 2 minutos. Después de ese tiempo, tapar los tubos y dejar en el baño durante otros 3 minutos.
11. Enfriar los tubos en un baño de hielo seco:etanol hasta que se congele el contenido.
12. Centrifugar durante 8 minutos a 12,800 rpm.
13. Recuperar la fase acuosa con ayuda de una micropipeta. Repetir los pasos 9-12 dos veces más para un total de 3 extracciones.
14. Recuperar la fase acuosa y transferir a un tubo de plástico nuevo de 1.5 mL al que previamente se le añadieron 5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.

15. Añadir 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1 y agitar por vortex durante 1 minuto.
16. Centrifugar durante 5 minutos a 12,800 rpm. Tomar 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y transferirlos a tubos de plástico de 1.5 mL.
17. Agregar 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M y 1 mL de etanol exclusivo para RNA.
18. Meter los tubos en un baño de hielo seco:etanol hasta que se congelen.
19. Centrifugar durante 15 minutos a 12,800 rpm y desechar el sobrenadante.
20. Lavar el botón de células, sin resuspender, con etanol 80%. Centrifugar durante 1 minuto a 12,800 rpm.
21. Desechar el sobrenadante y secar el botón al aire. Una vez seco, resuspender con 50  $\mu\text{L}$  de agua con DEPC.
22. Almacenar el RNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **C8. Electroforesis de RNA en geles de agarosa con formaldehido**

1. Limpiar previamente la cámara y el tanque de electroforesis con SDS ( 1% y enjuagar con una solución de agua con DEPC.
2. Para preparar el gel, mezclar 1 gramo de agarosa con 84 mL de agua y 10 mL de amortiguador MAE 10X (anexo A). Hervir durante 30 segundos y después dejar enfriar. Cuando alcance una temperatura de aproximadamente  $55^{\circ}\text{C}$ , añadir 6 mL de formaldehido. Vaciar al molde para que gelifique.
3. Para preparar la muestra, mezclar 4  $\mu\text{L}$  de RNA con 40  $\mu\text{L}$  de amortiguador de RNA 1.25X (anexo A) y 2  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Calentar las muestras a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Centrifugar durante 10 segundos para mezclar y aplicar la muestra al gel.
4. Correr el gel a 60-80 volts durante 3 horas aproximadamente.
5. Ver el gel en el transiluminador.

### **C9. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa**

1. Añadir en un tubo de polipropileno de 50  $\mu\text{L}$  libre de nucleasas lo siguiente:
  - 2 pmol de oligonucleótido específico para amplificar el gen de interés (oligo *reverse* o anti sentido)

10 pg- 5 mg de RNA total

1  $\mu$ L de dNTP Mix 10mM (Invitrogen)

Agua desionizada estéril para completar 13  $\mu$ L.

2. Calentar la mezcla a 65°C durante 5 minutos y posteriormente incubar en hielo durante 1 minuto.
3. Centrifugar la mezcla unos segundos y añadir:
  - 4  $\mu$ L de amortiguador *First-Strand 5X* (Invitrogen)
  - 1  $\mu$ L de DTT 0.1M
  - 1  $\mu$ L de Inhibidor de RNasa recombinante *RNaseOUT* (Invitrogen)
  - 1  $\mu$ L de enzima SuperScript III RT (Invitrogen)
4. Mezclar con ayuda de una micropipeta.
5. Incubar a 55°C durante 60 minutos.
6. Inactivar la reacción calentando las muestras a 70°C por 15 minutos.
7. Utilizar el cDNA resultante como templado para una reacción de amplificación por PCR.

---

## 12. REFERENCIAS

1. Madigan M., Martinko J., Parker J. **Brock. Biología de los Microorganismos.** Décima edición. Pearson, Prentice Hall. Madrid, 2004.
2. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España. **Seres modélicos: entre la naturaleza y el laboratorio.** Recuperado de: (<http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>)
3. Fidel P., Vazquez J., Sobel J., ***Candida glabrata*: review of epidemiology, Pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*.** Clinical Microbiology Reviews 1999, 12 (1); 80-96
4. Bialková A., Subík J. **Biology of pathogenic yeast *Candida glabrata*.** Folia Microbiológica 2006, 51 (1); 3-20
5. Dujon B. **Hemiascomycetous yeasts at the forefront of comparative genomics.** Current Opinion in Genetics & Development 2005, 15; 614-620
6. Roetze A., Gabaldón T., Schüller. **From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen.** FEMS Microbiology Letters 2010, 314 (1); 1-9
7. Wong S., Fares M., Zimmermann W., Butler G. Wolfe K. **Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the asexual pathogenic yeast *Candida glabrata*.** Genome Biology 2003, 4; R10.1-R10.9
8. Srikantha T., Lachke S., Soll D. **Three mating type-like loci in *Candida glabrata*.** Eukaryot Cell 2003, 2 (2); 328-340
9. Herskowitz I. **Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiological Reviews 1988, 52 (4); 536-553
10. Conde-Ferrández L. **El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación.** Revista Iberoamericana de Micología 2007, 24; 95-99

11. Muller H., Hennequin C., Gallaud J., Dujon B., Fairhead C. **The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and  $\alpha$  haploid mating types.** Eukaryotic Cell 2008, 7 (5); 848-858
12. Fabre E., Muller H., Therizols P., Lafontaine I., Dujon B., Fairhead C. **Comparative genomics in hemiascomycete yeast: evolution of sex, silencing and subtelomeres.** Molecular Biology and evolution 2005, 22 (4); 856-873
13. Klar A. **The yeast mating-type switching mechanism: a memoir.** Genetics 2010, 186; 443-449
14. Montelone B. **Yeast mating type.** Encyclopedia of life Sciences 2003. Macmillian Publishers Ltd
15. Wang Y., Dohlman H. **Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine.** Science 2004, 306;1508-1509
16. Naider F., Becker J. **The  $\alpha$ -factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptor.** Peptides 2004, 25; 1441-1463
17. Hodnett-Ap (Ap Biology Web Resource Project). **Chapter 11: cell communication.** Recuperado de: (<http://hodnett-ap.wikispaces.com>)
18. Manfredi J., Klein C., Jerrero J., Byrd D., Trueheart J., Wiesler W., Fowlkes D., Broach J. **Yeast alpha mating factor structure-activity relationship derived from genetically selected peptide agonists and antagonists of Ste2p.** Molecular and Cellular Biology 1996, 16 (9); 4700-4709
19. New D., Wong Y. **Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression.** Journal of Molecular Signaling 2007, 2:2
20. Kristiansen K. **Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function.** Pharmacology and therapeutics 2004, 103 (1); 21-80
21. Dosil M., Schandel K., Gupta E., Jenness D., Konopka J. **The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -factor receptor contributes of the formation of**

- preactivation complexes with its cognate G protein.** Molecular and Cellular Biology 2000, 20 (14); 5321-5329
22. Duran M., Ongay L., Zentella A., Coria R. **The carboxy-terminal-tail of the ste2 receptor is involved in activation of the g protein in the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -pheromone response pathway.** FEMS Microbiology Letters 2001, 197: 65-71
23. Kim K., Lee Y., Uddin M., Hauser M., Naider F., Becker J. **Multiple regulatory roles of the carboxy terminus of Ste2p a yeast GPCR.** Pharmacological Research 2012, 65; 31-40
24. Shi C., Kendall S., Grote E., Kaminskyj S., Loewen M. **N-terminal residues of the yeast pheromone receptor, Ste2p, mediate mating events independently of G1-arrest signaling.** Journal of Cellular Biochemistry 2009, 107; 630-638
25. Dohlman H. **G proteins and pheromone signaling.** Annual Review of Physiology 2002, 64; 129-152
26. Pincus D., Ryan C., Smith R., Brent R., Resnekov O. **Assigning quantitative function to post-translational modifications reveals multiple sites of phosphorylation that tune yeast pheromone signaling output.** Plos One 2013, 8 (3); e56544
27. Bardwell L. **A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway.** Peptides 2004, 25; 1465-1476
28. Herskowitz I. **MAP kinase pathway in yeast: for mating and more.** Cell 1995, 80 (2); 187-197
29. Elion E., Brill J., Fink G. **Functional redundancy in the yeast cell cycle: FUS3 and KSS1 have both overlapping and unique functions.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1991, 56; 41-49
30. Rensing L., Ruoff P. **How can yeast cell decide between three activated MAP kinase pathway? A model approach.** Journal of Theoretical Biology 2009, 257 (4); 578-587
31. Dolan J. **Novel aspects of pheromone-induced cell cycle arrest in yeast.** Current Genetics 1996, 30; 469-475

- 
32. Horecka J., Sprague G. **Identification and characterization of FAR3, a gene required for pheromone-mediated G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics 1996, 144; 905-921
33. Charkasova V., Lyons D., Elion E. **Fus3p and Kss1p control G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae* through a balance of distinct arrest and proliferative functions that operate in parallel with Far1p.** Genetics 1999, 151; 989-1004
34. Gartner A., Jovanovich A., Jeoung D., Bourlat S., Cross F., Ammerer G. **Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, In Vivo.** Molecular and Cellular Biology 1998, 18 (7); 3681-3691
35. Wilkinson M., Millar J. **Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways.** The FASEB Journal 2000, 14; 2147-2157
36. Matheos D., Metodiev M., Muller E., Stone D., Rose M. **Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p.** The Journal of Cell Biology 2004, 165 (1); 99-109
37. Yu L., Qi M., Sheff M., Elion E. **Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G1 cyclin-dependent kinase.** Molecular and Biology of the Cell 2008, 19 (4); 1739-1752
38. Merlini L., Dubin O., Martin S. **Mate and fuse: how yeast cells do it.** Open Biology 2013, 3:130008
39. GE healthcare Dharmacon RNAi & Gene Expression. Recuperado de: (<http://dharmacon.gelifesciences.com/non-mammalian-cdna-and-orf/yeast-knockout-collection/>)
40. Domergue E., Castaño I., De las Peñas A., Zupancic M., Lockett V., Hebel J., Johnson D., Cormack B. **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI.** Science 2005, 308; 866-870
41. Technical Manual Promega. **pGEM-T and pGEM-T Easy vector systems.** Recuperado de: (<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>)

- 
42. Green M., Sambrook J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cuarta edición. Cold Spring Harbor Laboratory press 2012. Volumen 1
43. Frieman M., McCaffery J., Cormack B. **Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein**. Molecular Microbiology 2002, 46 (2); 479-492
44. Mimberg D. Müller R. Funk M. **Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds**. Gene 1995, 156 (1); 119-122
45. Rodríguez J. **Caracterización de la actividad y estructura de los péptidos Troyanos**. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, UNAM, 2009
46. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. Molecular Biology and Evolution 2011, 28 (10); 2731-2739
47. Bateman A., Coin L., Durbin R., Finn R., Hollich V., Griffiths-Jones S., Khanna A., Marshall M., Moxon S., Sonnhammer E., Studholme D., Yeats C., Eddy S. **The Pfam protein families database**. Nucleic Acids research 2004, 32; D138-41
48. Xiong X., Song H., On T., Lochovsky L., Provart N., Parkinson J. **PhyloPro: a web-based tool for the generation and visualization of phylogenetic profiles across Eukarya**. Bioinformatics 2011, 27 (6); 877-878
49. Dosil M., Giot L., Davis C., Konopka J. **Dominant-negative mutations in the G-protein-coupled alpha-factor receptor map to the extracellular ends of the transmembrane segments**. Molecular and cellular Biology 1998, 18 (10); 5981-5991
50. Chothia C., Lesk A. **The relation between the divergence of sequence and structure in proteins**. The EMBO Journal 1986, 5 (4); 823-826
51. Chung S., Subbiah S. **A structural explanation for the twilight zone of protein sequence homology**. Structure 1996, 4 (10); 1123-1127

- 
52. Olson K., Nelson C., Tai G., Hung W., Yong C., Astell C., Sadowski I. **Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-response transcription by separate mechanisms.** *Molecular and Cellular Biology* 2000, 20 (12); 4199-4209
53. Rost B. **Twilight zone of protein sequence alignments.** *Protein Engineering* 1999, 12 (2); 85-94
54. Rost B. **Protein structures sustain evolutionary drift.** *Folding & Design* 1997, 2; S19-S24
55. Rost B., O'Donoghue S. **Sisyphus and prediction of protein structure.** *Computer applications in the Biosciences* 1997, 13 (4); 345-356
56. Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J., Chitsaz F., Derbyshire M., DeWeese-Scott C., Fong J., Geer L., Geer R., Gonzales N., Gwadz M., Hurwitz D., Jackson J., Ke Z., Lanczycki J., Lu F., Marchler G., Mullokandov., Omelchenko M., Robertson C., Song J., Thanki N., Yamashita R., Zhang D., Zhang N., Zheng C., Bryant S. **CDD: a conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.** *Nucleic Acids Research* 2011, 39; D225-D229
57. Pawson T., Nash P. **Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains.** *Science* 2003, 300; 445-452
58. Tordai H., Nagy A., Farkas K., Bányai L., Patthy L. **Modules, multidomain proteins and organismic complexity.** *The FEBS Journal* 2005, 272 (19); 5064-5078
59. Alby K., Schaefer D., Bennett R. **Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*.** *Nature* 2009, 460 (7257); 890-893
60. Bennett R. **Coming of age-Sexual reproduction in *Candida* species.** *PLoS Pathogens* 2010, 6 (12); e1001155
61. Sumimoto H., Kamakura S., Ito T. **Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas and plants.** *Science Signaling* 2007, 2007 (401); re6
62. Zarrinpar A., Bhattacharyya R., Lim W. **The structure and function of proline recognition domains.** *Science STKE* 2003, 2003 (179); re8

- 
63. Pellegrini M. **Bacterial Molecular Networks: methods and protocols, methods in Molecular Biology. Chapter 9: Using phylogenetic profiles to predict functional relationships.** Jacques van Helden eds. 2012
64. Sun J., Xu J., Liu Z., Liu Q., Zhao A., Shi T., Li Y. **Refined phylogenetic profiles method for predicting protein-protein interactions.** *Bioinformatics* 2005, 21 (16); 3409-3415
65. Navarro R., Kawasaki L., Dominguez L., Ongay L., Pérez R., Coria R. **The  $\beta$  subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the  $\gamma$  subunit.** *Molecular Biology of the Cell* 2010, 21;489-498
66. Farley F., Satterberg B., Goldsmith E., Elion E. **Relative dependence of different outputs of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway on the MAP kinase Fus3p.** *Genetics* 1999, 151; 1425-1444
67. Schwarts M., Madhani H. **Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Annual Review of Genetics* 2004, 38; 725-748
68. Maleri S., Ge Q., Hackett E., Wang Y., Dohlman H., Errede B. **Persistent activation by constitutive Ste7 promotes Kss1-mediated invasive growth but fails to support Fus3-dependent mating in yeast.** *Molecular and Cellular Biology* 2004, 24 (20); 9221-9238
69. Pryciak P., Huntress F. **Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G $\beta\gamma$  complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway.** *Genes & Development* 1998, 12; 2684-2697
70. Mahanty S., Wang Y., Farley F., Elion E. **Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade.** *Cell* 1999, 98; 501-512
71. Lamson R., Takahashi S., Winters M., Pryciak P. **Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity.** *Current Biology* 2006, 16; 618-623
72. Dowell S., Bishop A., Dyos S., Brown A., Whiteway M. **Mapping of a yeast G protein  $\beta\gamma$  signaling interaction.** *Genetics* 1998, 150; 1407-1417

73. Manahan C., Patnana M., Blumer K., Linder M. **Dual lipid modification motifs in G $\alpha$  and G $\gamma$  subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Biology of the Cell* 2000, 11; 957-968
74. Miyajima I., Nakufuku M., Nakayama N., Brenner C., Miyajima A., Kaibuchi K., Arai K., Kaziro Y., Matsumoto K. **GPA1, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction.** *Cell* 1987, 50; 1011-1019
75. Stratton H., Zhou J., Reed S., Stone D. **The mating-specific G $\alpha$  protein of *Saccharomyces cerevisiae* downregulates the mating signal by a mechanism that is dependent on pheromone and independent of G $\beta\gamma$  sequestration.** *Molecular and Cellular Biology* 1996, 16 (11); 6325-6337
76. Sánchez E., Kawasaki L., Ongay L., Coria R. **The G $\alpha$  subunit signals through the Ste50 protein during the mating pheromone response in the yeast *Kluyveromyces lactis*.** *Eukaryotic Cell* 2011, 10 (4); 540-546
77. Ladds G., Goddard A., Davey J. **Functional analysis of heterologous GPCR signaling pathways in yeasts.** *Trends Biotechnol* 2005, 23 (7); 367-373
78. Shpakov A., Pertseva M. **Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution.** *International Review of Cell and Molecular Biology* 2008, 269;151-282
79. Valtz N., Peter M., Herskowitz I. **FAR1 is required for oriented polarization of yeast cell in response to mating pheromones.** *The Journal of Cell Biology* 1999, 131 (4); 863-873
80. Butty A., Pryciak P., Huang L., Herskowitz I., Peter M. **The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating.** *Science* 1998, 282 (5393); 1511-1516
81. Nolan S., Cowan A., Koppel D., Jin H., Grote E. **FUS1 regulates the opening and expansion of fusion pores between mating yeast.** *Molecular Biology of the Cell* 2006, 17; 2439-2450
82. Nelson B., Parsons A., Evangelista M., Schaefer K., Kennedy K., Ritchie S., Petryshen T., Boone C. **Fus1p interact with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling**

- pathways to control cell fusion during yeast mating.** Genetics 2006, 166; 67-77
83. Bhattacharyya R., Reményi A., Good M., Bashor C., Falick A., Lim W. **The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway.** Science 2006, 311; 822-826
84. Good M., Tang G., Singleton J., Remenyi A., Lim W. **Scaffold-assisted catalysis: a novel domain in the Ste5 scaffold protein is required to unlock MAPK Fus3 for phosphorylation by the MAPKK Ste7.** Cell 2009, 136 (6); 1085-1097
85. Torres F., Kawasaki L., Rodríguez M., Patrón A., Coria R. **The *KISTE2* and *KISTE3* genes encode MAT $\alpha$ - and MAT $\alpha$ -specific G-protein-coupled receptors, respectively, which are required for mating of *Kluyveromyces lactis* haploid cells.** Yeast 2007, 24; 17-25
86. Coria R., Kawasaki L., Torres F., Ongay L., Sánchez E., Velázquez N., Navarro R., Rodríguez M., Aguilar R., Coello G. **The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*.** FEMS Yeast Research 2006, 6 (3); 336-344
87. Yáñez P., Robledo K., Ramírez C., De Las Peñas A., Castaño I. **The mating type-like loci of *Candida glabrata*.** Revista Iberoamericana de Micología 2014, 31 (1);30-34
88. Calcagno A., Bignell E., Rogers T., Jones M., Mühlischlegel F., Haynes K. ***Candida glabrata* Ste11 is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence.** Medical Mycology 2005, 43;355-364
89. Calcagno A., Bignell E., Warn P., Jones M., Denning D., Mühlischlegel F., Rogers T., Haynes K. ***Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation.** Molecular Microbiology 2005, 50 (4);1309-1318
90. Calcagno A., Bignell E., Roger T., Canedo M., Mühlischlegel F., Haynes K. ***Candida glabrata* Ste20 nis involved in maintaining cell wall integrity and adaptation to hypertonic stress, and is required for wilg-type levels of virulence.** Yeast 2004, 21;557-568