

11281
22



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**EL GEN *Fus1* DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*;
CARACTERIZACION E INTERRELACION CON DOS
MODULADORES POSITIVOS DEL SISTEMA DE
RESPUESTA A LAS FEROMONAS DE APAREAMIENTO.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
ALEJANDRO LLORET SANDOVAL**

TUTOR: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

CIUDAD UNIVERSITARIA, DISTRITO FEDERAL

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Agradecimientos

Alguien dijo alguna vez que cuando no se tiene nada que agradecer, entonces la vida de esa persona es muy triste. Afortunadamente yo tengo a muchas personas a las cuales darles las gracias por todo lo que han hecho en mi vida, porque gracias a ellos estoy aquí, escribiendo estas líneas. Cabe aclarar que no están en un orden especial, porque mi corazón tiene un nivel de entropía bastante alto.

A mis jefes, el Dr. Roberto Coria y la Dra. Laura Ongay, por todo su apoyo, comprensión y tolerancia aún en los momentos de crisis. De ellos aprendí no solo las artes de la alquimia sino también a crecer como persona.

A los miembros de mi comité tutorial. Dra. Alicia González, por concederme el privilegio de tenerla como guía durante todo el trayecto del doctorado y escuchar la sabiduría de sus palabras. Al Dr. Ángel Zaráin, por todas sus críticas atinadas, su apoyo y su paciencia.

A mis compañeros del laboratorio. Mary, por enseñarme a poner un poco de orden en mi desordenada forma de trabajo. Soledad, ¿Qué hubiera hecho yo sin todas esas pláticas de las cuales he aprendido tanto de ti?. Jasmin, Julián, Charis y Paco, por hacerme ver que el entusiasmo del principio es el que debe prevalecer hasta el final. A Lupita Códiz, la flor silvestre de Huamantla, por recordarme que las cosas naturales y que vienen de lo más profundo de las personas es algo invaluable en este mundo. A Marcela y Minerva, por todo su apoyo y disposición durante mi transición en el Doctorado.

A Gerardo Coello y Juan Barbosa, por todo su apoyo en cuestiones de tecnología. A Luis Oropeza, Jorge Sepúlveda y Rodolfo Paredes, por toda su paciencia y su ayuda en este trabajo.

A Cristina Aranda y Lourdes Valenzuela, por toda su ayuda en temas para los cuales me declaré abiertamente neófito.

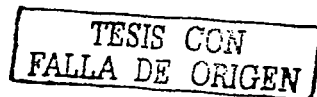
A Marychuy, mihijta, por ser mi confidente y mi amiga y Norberto, no tengo palabras para agradecerles todo su apoyo incondicional en mi vida académica y personal.

A Paty, mi queridísimo Pato, gracias por estar ahí, en mis momentos de desahogo o felicidad. La vida no es tan leve como para ser insoportable.

A Ramón, el Tigre (no de Santa Julia), por escucharme y hacerme ver que la vida es menos densa de lo que parece.

A los miembros de mi jurado, por todas sus atinadas sugerencias: Dr. Antonio Peña, Dr. Diego González, Dra. Laura Camarena, Dr. Luis Servín y Dr. Carlos Céspedes. Gracias.

A mis maestros de toda la vida. Mercedes, Ricardo y Judith, por darme las bases para mi vida académica y también personal. Al Dr. Víctor Valdés, por abrirme los ojos ante una parte de la ciencia desconocida para mí. Al Dr. León Cázares, Dr. Antonio Lazcano, y Dra.



Ma Esther Martínez y Biol. Carlos Castillo. Gracias por reforzar la convicción en mi carrera con todas sus enseñanzas.

Al Ing. Hérmes López y la Sra. Ruth Toral, por todo su cariño y apoyo en los momentos más difíciles, por dejarme entrar en su casa como uno más de su familia y quererme tal y como me presenté, mil gracias.

A Ruth, que pese a los baches hemos podido seguir andando en el camino, gracias.

A Hermes, por su ayuda incondicional en los momentos más difíciles, gracias.

A mis tíos Memo y Elsa, por todo su cariño, que de este lado es más que bien correspondido.

A mis padrinos Sergio y Graciela, por dejarme ser su ahijado pese a ser tan ateo y quererme como tal, mil gracias.

Al Sr. Juan Manuel Armendariz, por sus consejos invaluable, por todo lo que ha hecho por la persona más importante en mi vida, gracias.

A la Sra. Ofelia Lozada, gracias por el regalo que me dió, aunque no haya sospechado quién sería el destinatario final.

A los amigos que se quedaron a mi lado para no irse jamás y me ayudaron a salir a flote aún cuando el barco se hundía: Libia, Carlos R., Lizbeth, Jorge C y Eduardo A. Gracias por ser una parte tan importante en mi vida.

A Jorgen Guldmann, pese a la distancia compadre, gracias por todas tus palabras y tus enseñanzas.

A los miembros del NAOG, por todos esos momentos tan reconfortantes dentro de un mundo muy mío y que pude compartir. Aliah y Lukas, gracias.

A mis compañeras de mi clase de macramé. Ale, Monse, Clara, Juliette, Liliana y Miriam. Gracias por enseñarme a deshilar las hebras más oscuras. A Tere Guerra, por enseñarme a desenredar mi vida de los hilos que la tenían sujeta.

Al Dr. Carlos Rodríguez Ajenjo, no tengo el espacio suficiente como para darte las gracias por todo lo que has hecho a lo largo de mi vida. Carlitos, gracias por todo, desde el fondo de mi corazón.

A Mauricio, mi queridísimo Lennon, no tengo con que pagarte todo tu apoyo, tus consejos y tu amistad, hermano, gracias.

A mis hermanos de toda la vida. Octavio y Ricardo. Bulls, gracias por seguir conmigo durante todos estos años y por no perder el ánimo de continuar. Por haber compartido conmigo desde la risa franca hasta las lágrimas más amargas. Gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mi carnal Quique, gracias por honrarme con tu amistad y tu cariño, por seguir siendo parte de mi vida de esa manera tan incondicional. Gracias Carnal.

A Angelo, sensei, por todas tus enseñanzas dentro y fuera del dojo, por ayudarme a enfrentar mis mayores miedos de una manera honorable, por todo sensei, gracias.

A mi tía Laura, por ser mi primera gran maestra, por tu cariño y amor, por no perderme la fe, por todo tía, gracias. Si pude terminar esto es porque me enseñaste el valor del conocimiento, y eso lo atesoraré por siempre. Gracias.

A mi tía Judith, por su cariño a lo largo de todos los años de mi vida, por consentirme todo lo que lo ha hecho, Gracias

A mi tío Arnulfo, por su rectitud, su generosidad y su cariño incondicional. Arthur, esto te lo debía desde hace mucho, donde estés, espero que lo aceptes con todo el cariño de tu sobrino que te adora.

A mis abuelos:

Antonio "El princeso" por compartir toda tu sabiduría conmigo, por enseñarme con tu ejemplo a ser honrado, por todo tu cariño, gracias abuelo. Espero algún día llevar el nombre que me diste tan alto como quieres.

Trinidad, abuelo, por tu cariño, por enseñarme el valor del trabajo duro y no quejarme por hacerlo. Por enseñarme que el valor de las cosas radica en su naturaleza más simple. Gracias.

A Adrián, hermano, gracias por toda tu ayuda y por lo que me has enseñado. Espero que algún día tu también puedas ver que hay un mundo más allá de lo que vemos.

A mi hermana Valentina, gorda, quisiera resumir 22 años de vida en dos renglones, pero no puedo, porque tanta felicidad no cabe en tan poco espacio. Gracias por ser mi hermana y al mismo tiempo mi mejor amiga, mi confidente, y no en pocas ocasiones, el apoyo más grande que he tenido y seguiré teniendo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mi Papá, no necesito escribir todo un tratado para decirte todo lo que te quiero y te admiro, y todo lo que te agradezco por haberme enseñado la diferencia entre lo bueno y lo malo, por enseñarme con tu ejemplo a vivir de una forma congruente con mis ideales y no traicionarlos, por más difícil que parezca. Te ofrezco este trabajo, obra de las manos que tu mismo has hecho, esperando que estés tan orgulloso de mi como yo lo estoy de ti.

A mi Mamá, no hay nada que yo diga o haga para describirte todo el amor inconmensurable que te tengo, que tengo tanto por que agradecerte, tu cariño, tu apoyo, toda tu fé ciega en mí. Por enseñarme que el fruto del trabajo propio es la satisfacción más grande a la que alguien pueda aspirar, por heredarme esa alegría tan tuya que crea luz aún en lo más oscuro. Por enseñarme a ser generoso con lo que tengo. Por predicarme con tu ejemplo que si uno está seguro de lo que es, por más adversas que parezcan las cosas, siempre saldré adelante. Madre, he aquí el fruto de todos tus esfuerzos. Acéptalo del hijo que te adora y que espera que todo lo que has hecho haya valido la pena.

A mi Tita, abuela preciosa y madre invencible. Daría lo que fuera porque despertaras de tu sueño y vieras lo que lograste con todo tu amor ilimitado. Gracias por todo tu cariño, por tu amor, por tus consejos y tu guía, por protegerme y cuidarme, por consentirme todo lo que lo hiciste. Por cuidar que no me cayera al empezar a caminar y enseñarme a levantarme cada vez que lo hiciera. Cada montaña que escale, cada logro que tenga siempre será porque tú estas conmigo y se que siempre estarás orgullosa de tu niño. Esto Tita, va por ti.

A Edith, mi enano precioso. Amor mío, todo lo que me reste de vida no me bastará para agradecerte lo que has hecho por mí. Gracias por recordarme quién soy, gracias por dejar que tus ojos tan hermosos me iluminen el alma, gracias por sostener mi mundo entre tus manos, por devolverme la fe cuando la pierdo, por tu sabiduría. Gracias por estar a mi lado. No sé que hice para merecerte, lo que si sé es que voy a hacer lo mejor para seguir siendo digno de caminar a tu lado. Gracias por haber bajado del cielo y ser mi ángel guardián, gracias por dejarme alcanzar el infinito, por caminar a mi lado, por reírte con mi risa y llorar con mis lágrimas. Gracias por estar conmigo amor. Esto es tuyo, porque sin ti, yo no hubiera hecho nada de lo que he logrado. Te amo tesoro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatoria

A Edith

*"Hoy empezaremos a andar y a ver mundo, y a observar cómo la gente anda por ahí Y habla, el verdadero aspecto que tiene. Quiero verlo todo. Y aunque nada de ello sea yo cuando entren, al cabo de un tiempo, todo se reunirá en mi interior, y seré yo. Fijate en el mundo, Dios mío, Dios mío. Fijate en el mundo, fuera de mí, más allá de mi rostro, y el único medio de tocarlo verdaderamente es ponerlo allí donde por fin sea yo, donde estén la sangre, donde recorra mi cuerpo cien mil veces al día. Me apoderaré de ella de manera que nunca podrá escapar. **Algún día, me aferraré con fuerza al mundo. Ahora tengo un dedo apoyado en él. Es un principio.**"*

Ray Bradbury. Fahrenheit 410

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice

I. Resumen

II. Abreviaturas

1. Introducción

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

1.2- Transducción de señales en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

1.3- Transcripción sexo-específica de los genes de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

1.4- Papel del gen *Fus1* en la respuesta a feromonas sexuales en *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies.

2. Objetivo

3. Materiales y métodos

3.1- Cepas.

3.2- Técnicas de ADN recombinante.

3.3- Amplificación de fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

3.4- Purificación de ADN.

3.5- Purificación de ARN de levadura.

3.6- Construcciones.

3.7- Transformación de *E. coli*.

3.8- Transfección de levaduras.

3.9- Apareamientos cuantitativos.

3.10- Apareamientos cualitativos.

3.11 Determinación de la actividad de la enzima β -Galactosidasa en células haploides transfectadas de levaduras.

3.12 Paquetería.

3.13 Microscopía confocal.

4. Resultados.

4.1- Clonación del gen *Fus1* de *K. lactis*.

4.2- Análisis teórico del gen *Fus1* de *K. lactis*.

4.3- Papel del *Kifus1* en el apareamiento celular.

4.4- Complementación de una mutante $\Delta Scfus1$ de *S. cerevisiae* con el gen *KIFus1*.

4.5- Actividad transcripcional del *KIFus1* en respuesta a feromonas de apareamiento.

4.6- Efecto de *K/Gpa1* en la expresión de *KIFus1*.

4.7 - Papel de *K/Ste12p* en la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis*.

4.8- Relación entre *K/Ste12* y el elemento de control positivo de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*: *K/Gpa1*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.9- Localización subcelular de *KIFus1* en *K. lactis*.

5. Discusión

6. Conclusiones

7. Perspectivas

8. Bibliografía

Anexo 1

Publicación del trabajo en la revista *FEMS Microbiology Letters*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. Resumen

*Feliz aquél que pudo penetrar
las causas secretas de las cosas*
Los ríos de color púrpura

Kluyveromyces lactis, una levadura petit-negativa, ha sido estudiada en los últimos años con la finalidad de utilizarla como modelo de procesos celulares en organismos eucariontes superiores. En el laboratorio seguimos la línea de investigación que concierne a la cascada de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*, mediada por proteínas G. Este proceso está ampliamente descrito en *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo ascomyceto de la familia *Saccharomycetae* emparentado filogenéticamente con *K. lactis*. Gracias a esta relación, así como a los avances que se han logrado en el estudio de *S. cerevisiae*, se ha podido establecer la homología entre los componentes de ambos sistemas. Sin embargo, tenemos evidencia de que el proceso que estudiamos en *K. lactis* presenta características similares a los procesos semejantes de transducción en metazoarios superiores. En este trabajo se presenta la clonación y caracterización de un nuevo elemento del sistema de respuesta a feromonas de apareamiento, Fus1. Esta proteína de membrana se requiere para la conjugación sexual de las células haploides y su distribución en la célula depende del estado de diferenciación del gameto. La transcripción del gen que la codifica se activa en respuesta a feromonas de apareamiento de la célula del sexo contrario. Esta inducción también se presenta cuando se expresan dos elementos del sistema: una versión activa de la subunidad α de la proteína G heterotrímica y el factor transcripcional Ste12. El papel de la subunidad $G\alpha$ como transductor de la señal hormonal ya se había descrito. Sin embargo, no se había podido establecer su relación con otros componentes del sistema. Ste12 en *K. lactis* era un elemento conocido; no obstante, no se había probado su papel en el sistema de respuesta a feromonas en *K. lactis*. En este trabajo reportamos el papel de Ste12 como parte del sistema. Por los resultados obtenidos, podemos proponer un modelo de cómo pudiera llevarse a cabo la transducción de señales en la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II- Abreviaturas

| | |
|---------|--|
| μ l | Microlitros |
| 3AT | 3-aminotriazol |
| ADN | Ácido Deoxiribonucleico |
| AMP | Adenosin monofosfato |
| Amp | Ampicilina |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GDP | Guanosin difosfato |
| GTP | Guanosin trifosfato |
| Kan | Kanamicina |
| Kb | Kilopares de bases |
| Lb | Medio Luria-Bertani |
| MAPK | MAP cinasa (pl. MAPKs) |
| ml | mililitros |
| ONPG | O-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| r.p.m | Revoluciones por minuto |
| SD | Medio mínimo para levaduras |
| Tm | Temperatura media |
| WT | "Wild type". Tipo silvestre |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- *Cuando un hombre empieza a aprender, nunca sabe lo que va a encontrar. Su propósito es deficiente; su intención es vaga. Espera recompensas que nunca llegarán, pues no sabe nada de los trabajos que cuesta aprender.*

"Pero uno aprende así, poquito a poquito al comienzo, luego más y más. Y sus pensamientos se dan de topetazos y se hunden en la nada. Lo que se aprende no es nunca lo que uno creía. Y así se comienza a tener miedo. Cada paso del aprendizaje es un atolladero, y el miedo que el hombre experimenta empieza a crecer sin misericordia, sin ceder. Su propósito se convierte en un campo de batalla."

"El miedo es un enemigo terrible, traicionero y enredado como los cardos. Se queda oculto en cada recodo del camino, acechando, esperando. Y si el hombre, aterrado por su presencia, echa a correr, su enemigo habrá puesto fin a su búsqueda. Si el hombre corre por miedo, nada le pasa, solo que jamás aprenderá. Nunca llegará a ser hombre de conocimiento. Llegará a ser un maleante, o un cobarde cualquiera, un hombre inofensivo, asustado; de cualquier modo, será un hombre vencido. Su primer enemigo habrá puesto fin a sus ansias."

"(Para superar el miedo) El hombre no debe correr, debe desafiar su miedo, y pese a el debe de dar el siguiente paso en su aprendizaje, y el siguiente, y el siguiente. Debe estar lleno de miedo, pero no debe detenerse. ¡Esa es la regla!"

"Las Enseñanzas de Don Juan"
Carlos Castaneda.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Introducción

1.1- Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular de la familia *Sacharomycetae* que se encuentra de manera natural tanto en estado haploide como en el estado diploide. Las células en estado haploide pertenecen al sexo α o al sexo a (Herskowitz, 1988). Las células haploides de ambos sexos son morfológicamente idénticas. La única diferencia entre ambos tipos celulares estriba en la expresión de un grupo de genes que determinan el sexo. En las células en estado diploide estos genes no se expresan (Herskowitz y Oshima, 1981). En ambos estados, tanto haploide como diploide, las células presentan un crecimiento vegetativo en el cual se reproducen por gemación. Sólo cuando se encuentran células haploides de sexo opuesto se inicia la reproducción sexual. Este proceso está dividido en dos partes, la conjugación y la esporulación (fig. 1).

La conjugación se inicia cuando una célula haploide de un sexo recibe un estímulo por parte de factores sexuales, conocidos como feromonas de apareamiento, producidas y secretadas por la célula del sexo opuesto (Duntze *et al.*, 1970). La célula a produce un factor a y la célula α produce un factor α . Estas feromonas tienen su receptor específico en la membrana de la célula del sexo contrario. Cuando la feromona se une a su receptor se produce una cascada de señales necesarias para que se forme el gameto. Esta cascada de señales termina con la transcripción de los genes cuyos productos provocan la interrupción del ciclo celular en la fase G_1 , y una serie de cambios morfológicos, adquiriendo una forma de pera conocida como "shmoo", seguido de un aglutinamiento de los gametos y por último la fusión membranal y nuclear de estos gametos para formar diploides (Kurjan, 1990; Lipke y Kurjan, 1992).

El estado diploide es estable, pero la esporulación se induce cuando el ambiente es desfavorable para la célula. En tal caso entran en un proceso de división meiótica para producir cuatro ascosporas. Toda vez que se liberan, maduran y germinan, dan origen a células haploides de ambos sexos, dos de sexo a y dos de sexo α , las cuales pueden seguir el ciclo vegetativo o el ciclo sexual de reproducción (Duntze *et al.* 1970).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

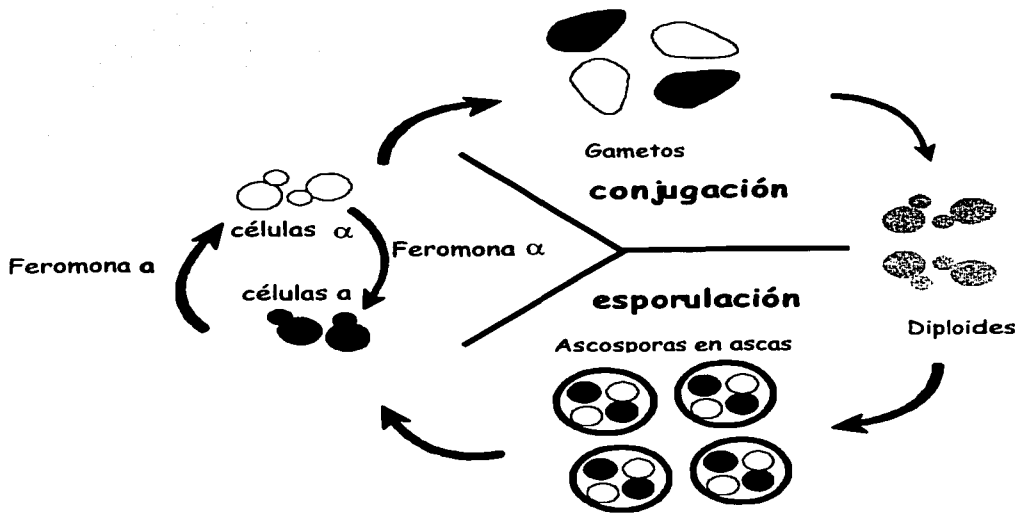


Figura 1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2- Transducción de señales en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

Para que se lleve a cabo la conjugación sexual de las células se requiere de un proceso que se conoce como respuesta a feromonas de apareamiento. La vía por la cual se lleva a cabo está actualmente bien caracterizada en la levadura *S. cerevisiae* y es un ejemplo del fenómeno de transducción de señales mediada por proteínas G (fig. 2) (Herskowitz, 1988; Coria, 1993; Oehlen y Cross, 1994).

En las células haploides, el receptor para la feromona de la célula del sexo contrario se localiza en la membrana celular. Este receptor está a su vez acoplado a una proteína G heterotrímica cuyas subunidades son: $G\alpha$, codificada por el gen *Gpa1*; $G\beta$, codificada por el gen *Ste4*, y $G\gamma$, codificada por el gen *Ste18*. Esta proteína G une, en la subunidad $G\alpha$, nucleótidos de guanina en forma de GDP o GTP. Cuando las tres subunidades están unidas se encuentran acopladas al receptor de feromona. En este estado, la subunidad $G\alpha$ tiene asociado un GDP. Cuando el receptor interactúa con su ligando provoca un cambio conformacional que altera su asociación con el heterotrímico de la proteína G. Esta alteración causa a su vez que la subunidad $G\alpha$ intercambie su GDP por un GTP, formando un complejo que tiene baja afinidad por el dímero $\beta\gamma$ (Cross, 1990; Neer, 1995). El dímero $\beta\gamma$ activa una serie de proteínas cinasas conocidas como Ste, provocando una cascada de señales que al final resulta en la fosforilación de la proteína Ste12 (Nakayama *et al.*, 1998). Ste12 es un factor transcripcional que activa los genes necesarios para llevar a cabo el proceso de apareamiento que dará como resultado la formación de los diploides (Oehlen *et al.* 1996). La proteína fosforilada Ste12 reconoce una secuencia denominada PRE ("Pheromone Response Element"), localizada en la región promotora de muchos genes involucrados en el sistema de respuesta a feromona (Trueheart *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1991; Crosby *et al.*, 2000).

Dentro de las levaduras pertenecientes a los ascomycetes, el sistema de respuesta a feromonas se ha estudiado ampliamente en *S. cerevisiae*. Sin embargo, existen otras levaduras donde la investigación de los sistemas de transducción está en etapas iniciales, en cuanto a no sólo conocer cómo es que los organismos responden a estímulos ambientales, sino también para definir las semejanzas y diferencias respecto al sistema de respuesta a feromonas de *S. cerevisiae*. En este contexto, iniciamos el estudio del sistema de apareamiento de *K. lactis*; una levadura petit negativa, que, a diferencia de *S. cerevisiae*, es esencialmente aeróbica (Fukuhara *et al.*, 1996). En *K. lactis*, la transducción de señales en respuesta a feromonas sexuales se ha estudiado sólo en fechas recientes y se desconocen casi todos los elementos involucrados en su sistema. Fisiológicamente, el proceso de conjugación sexual en *S. cerevisiae* y *K. lactis* se lleva a cabo de manera semejante; *K. lactis* presenta dos tipos celulares, denominados a y α (Fukuhara *et al.* 1996). Se ha reportado que las células de tipo alfa producen el factor sexual α (Brake *et al.* 1988) y se piensa que las células de tipo a producen feromona de tipo a (Fukuhara *et al.* 1996; Brake *et al.*, 1988). En el laboratorio tenemos evidencia de que estas feromonas son secretadas al medio, tal como sucede en *S. cerevisiae* (Michaelis y Herskowitz, 1988) ya que cuando se exponen las células de un tipo al caldo de cultivo donde se crecieron células del sexo contrario a saturación, interrumpen su ciclo celular y permanecen en la fase G_1 .

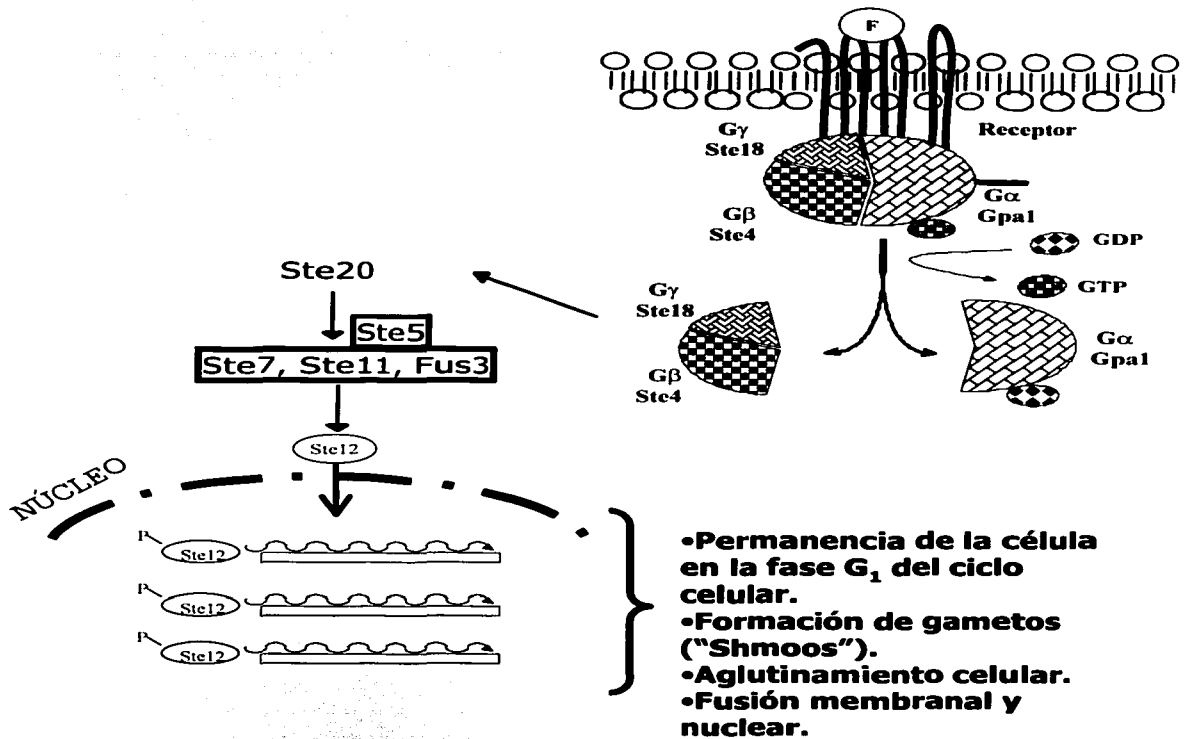


Figura 2. Sistema de respuesta a las feromonas sexuales en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta feromona pudiera ser reconocida por su receptor específico en la célula haploide de sexo contrario. En el laboratorio clonamos la secuencia completa del gen *Ste3* de *K. lactis* (*KlSte3*) a partir de la secuencia parcial reportada en el banco de datos (Souciet *et al.*, 2000; Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000). La secuencia primaria de *KlSte3* presenta una identidad del 55% con el receptor que reconoce a la feromona a en *S. cerevisiae* (*ScSte3*).

La estructura secundaria de la proteína *Ste3* de *K. lactis* (*KlSte3*) muestra que contiene siete dominios transmembranales, de la misma manera que la proteína *ScSte3*. *ScSte3* está clasificado dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) aunque de manera separada, debido a que su secuencia de aminoácidos no presenta homología con todos los demás receptores que la integran (cerca de 2000) (Ji *et al.*, 1998). Los GPCRs comparten características estructurales similares; el extremo amino es extracelular, mientras el carboxilo es intracelular; todos presentan siete dominios transmembranales conectados por medio de tres asas intracelulares y tres extracelulares. La función de estos receptores es transmitir la señal al interior celular mediante la interacción de su extremo carboxilo con la proteína G heterótrimerica (Strader *et al.*, 1995). En el caso de *S. cerevisiae*, se ha caracterizado ampliamente la interacción del receptor de la feromona con las subunidades alfa y beta de la proteína G heterótrimerica (Dube y Konopka, 1998). En el laboratorio tenemos evidencia de que el extremo carboxilo de la proteína *KlSte3* interacciona con la subunidad $G\alpha$ (*KlGpa1*) y con la subunidad $G\beta$ (*KlSte4*), que forman parte de la proteína G heterótrimerica en *K. lactis*. Tenemos también evidencia de que la respuesta a feromonas en *K. lactis* se encuentra mediada por la proteína G acoplada al receptor de la feromona, ya que las mutantes en *KlGpa1* o en *KlSte4* no responden a la feromona y presentan un fenotipo estéril (Saviñón *et al.*, 2001; Durán-Avelar *et al.*, 2001).

En *K. lactis* pensamos que, una vez activada la vía de respuesta a feromonas, los gametos requieren probablemente de un proceso de aglutinación y seguramente de un proceso de fusión para formar el diploide. El estado diploide en *K. lactis*, a diferencia de *S. cerevisiae*, es muy inestable (Herman y Roman, 1966; Fukuhara *et al.*, 1996). Cuando el ambiente es desfavorable para la célula, la forma diploide en *K. lactis* comienza rápidamente un proceso de división meiótica, que da como resultado cuatro ascosporas que se liberan, maduran y germinan, produciendo dos células haploides de cada sexo, los cuales pueden seguir el ciclo vegetativo o el ciclo sexual de reproducción al igual que en *S. cerevisiae* (Fukuhara *et al.*, 1996).

1.3- Transcripción sexo-específica de los genes de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

En la levadura *S. cerevisiae* existen dos tipos sexuales, **a** y α , que cuando se conjugan sexualmente dan como resultado un diploide tipo **a**/ α . El tipo sexual está determinado por la expresión de uno de los alelos localizados en el locus **Mat**, **Mata** o **Mat α** (Miller, 1984). El locus **Mata** contiene dos factores, el $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En las células α , $\alpha 1$ activa los genes α -específicos mientras que $\alpha 2$ reprime la transcripción de los genes **a**-específicos (Keleher *et al.*, 1989). En las células de tipo **a**, los genes **a**-específicos se transcriben constitutivamente. En el diploide, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se unen para reprimir la transcripción de los genes haploide-específicos (Shore *et al.*, 1984). La transcripción de los genes sexo-específicos en las células haploides de *S. cerevisiae* presentan una diferencia entre ambos tipos celulares, **a** y α (Sprague *et al.* 1983). La diferencia en la transcripción de los genes en ambos sexos de *S. cerevisiae* se encuentra determinada en tres niveles. El primero tiene que ver con la identidad celular, dada por la presencia del receptor de la feromona del sexo contrario y la síntesis de la feromona del mismo sexo (Bender y Sprague, 1989). En el segundo, la transcripción de los genes sexo específicos depende de la integridad de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento (Hagen *et al.*, 1991). El tercero es la regulación dada por **ScMcm1**; esta proteína es un factor transcripcional que se requiere para la activación de los genes α -específicos por medio de la interacción con $\alpha 1$ y la represión de los **a**-específicos mediante la interacción con $\alpha 2$ (Keleher *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1988; Jarvis *et al.*, 1989; Passmore *et al.*, 1988; Passmore *et al.*, 1989; Ammerer, 1990). **ScMcm1** participa en la activación de los genes en la vía de respuesta a las feromonas mediante el reconocimiento de una secuencia localizada en el promotor de los genes de tipo **a** y la interacción directa con **ScSte12** (Christ y Tye. 1991), mientras que, en células de tipo α , esta interacción, y por lo tanto la transcripción activada por **ScSte12p**, está mediada por la proteína $\alpha 1$ (Yuan *et al.* 1993).

K. lactis tiene también dos tipos sexuales, **a** y α , determinado por el alelo localizado en el locus **Mat** (**Mata** o **Mata α**) que cuando se conjugan sexualmente dan como resultado un diploide tipo **a**/ α . *K. lactis* en su locus α contiene tres genes, el $\alpha 1$ y $\alpha 2$, similares a sus contrapartes en *S. cerevisiae*, y un tercero, $\alpha 3$ (Astrom *et al.*, 2000). Tanto **Kl $\alpha 1$** como **Kl $\alpha 2$** participan de la misma manera en el mantenimiento del tipo sexual de *K. lactis* de la misma forma que **Sc $\alpha 1$** y **Sc $\alpha 2$** en *S. cerevisiae*. $\alpha 3$ parece también tener la función de participar en este evento, pero de una manera dependiente de la presencia de $\alpha 1$ (Astrom *et al.* 2000). Al parecer, la interacción de **KlSte12** y **Kl $\alpha 1$** es importante para la activación de los genes α -específicos. En el trabajo donde se reporta el papel de **KlSte12** en la inducción de genes α -específicos en *S. cerevisiae* se observó que, aunque **KlSte12** era capaz de complementar una mutante de tipo **a** en *S. cerevisiae* que lleva la interrupción de **Δ Scste12** cuando se expresaba en un alto número de copias, en las células de tipo α con la interrupción **Δ Scste12**, el apareamiento sólo podía restituirse cuando se co-expresaba la proteína $\alpha 1$ de *K. lactis*, lo que indica que **KlSte12** no es capaz de interactuar con $\alpha 1$ de *S. cerevisiae* y por lo tanto existe una deficiencia en la interacción con **ScMcm1** (Yuan *et al.* 1993). Esta observación se vió reforzada por la interacción *in vitro* entre **KlSte12** y **Kl $\alpha 1$** ,

1.4- Papel del gen *Fus1* en la respuesta a feromonas sexuales en *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies.

Uno de los genes cuya transcripción se activa en la respuesta a las feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* es el gen *Fus1* (*ScFus1*). El marco de lectura abierto de *ScFus1* se encuentra localizado en el cromosoma III (Egel, 1994), tiene una longitud de 2111 nucleótidos (McCaffrey *et al.* 1987) y codifica para una proteína de membrana (*ScFus1*) con un peso de 58 kDa (Trueheart y Fink, 1989). La *ScFus1* es una proteína que presenta un solo cruce transmembranal y que se ubica en la membrana plásmática de las formas conocidas como “shmoos”, principalmente en la zona correspondiente a la punta de la elongación (Trueheart y Fink, 1989). Esta zona es por donde se lleva cabo la fusión membranaral y se establece un puente citoplasmático, por donde se lleva a cabo la fusión de los núcleos, uno de los últimos pasos en el proceso de la fusión celular (Trueheart *et al.*, 1987; Elion, 1995). Se piensa que el extremo amino terminal de *ScFus1* está involucrado en el reconocimiento del sitio de unión célula-célula, ya que las células que expresan una versión de la proteína sin el extremo amino no pueden establecer la fusión membranaral al no establecerse el sitio de contacto entre las células haploides (Gammie *et al.*, 1998). La ubicación de *ScFus1* en el sitio de fusión es importante porque determina dónde se van a ubicar las enzimas encargadas de degradar la pared celular en el punto de contacto, el establecimiento de la maquinaria proteica encargada de la fusión membranaral y nuclear de los gametos, así como también de la estabilidad de la membrana. En esta parte del proceso de la fusión membranaral, el extremo carboxilo terminal juega un papel determinante, ya que células que expresan una versión trunca de *ScFus1* en esta parte de la proteína no pueden establecer el puente citoplasmático necesario para que se fusionen las células, presentan defectos en la fusión de los núcleos y no pueden formar el diploide (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987; Sprague y Thorner, 1992; Elion, 1995). Los trabajos para definir qué parte del extremo carboxilo está involucrada en el despliegue de estas funciones se han enfocado principalmente hacia un dominio llamado SH3, presente en esta parte de *ScFus1* (Rodaway *et al.*, 1989). La función del dominio SH3 no se comprende bien, pero hasta ahora se cree que pudiera mediar el ensamblaje de distintos complejos proteicos mediante la unión de este dominio a proteínas con secuencias ricas en prolina (Noble *et al.*, 1993; Morton y Campbell, 1994). Si esto es cierto, entonces este dominio pudiera ser responsable del establecimiento de las proteínas encargadas de llevar a cabo la fusión membranaral (Sprague y Thorner, 1992; Elion, 1995; Moskow *et al.*, 2000). Hasta el momento, sólo se tiene la certeza de que el dominio SH3 presente en el extremo carboxilo terminal de *ScFus1* interactúa directamente con los filamentos de actina (Amberg *et al.*, 1995), que intervienen en la reorganización del citoesqueleto durante la formación del “shmoo” en la respuesta a feromonas de apareamiento.

La secuencia del promotor del gen *Fus1* tiene tres copias de la secuencia TGAAAC y corresponde a la secuencia PRE (“Pheromone Response Element”) de *S. cerevisiae* (Trueheart *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1991). Esta secuencia es característica de los genes cuya transcripción se activa por el factor transcripcional ScSte12 únicamente cuando la vía está encendida (Hagen *et al.*, 1991). En el caso del *ScFus1*, se ha caracterizado su respuesta de tal suerte que se le utiliza como reportero para determinar no solo el papel de muchos elementos intrínsecos del sistema, sino también el efecto que tienen elementos de otros

1.3- Transcripción sexo-específica de los genes de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

En la levadura *S. cerevisiae* existen dos tipos sexuales, **a** y α , que cuando se conjugan sexualmente dan como resultado un diploide tipo **a**/ α . El tipo sexual está determinado por la expresión de uno de los alelos localizados en el locus *Mat*, *Mata* o *Mata* (Miller, 1984). El locus *Mata* contiene dos factores, el $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En las células α , $\alpha 1$ activa los genes α -específicos mientras que $\alpha 2$ reprime la transcripción de los genes **a**-específicos (Keleher *et al.*, 1989). En las células de tipo **a**, los genes **a**-específicos se transcriben constitutivamente. En el diploide, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se unen para reprimir la transcripción de los genes haploide-específicos (Shore *et al.*, 1984). La transcripción de los genes sexo-específicos en las células haploides de *S. cerevisiae* presentan una diferencia entre ambos tipos celulares, **a** y α (Sprague *et al.* 1983). La diferencia en la transcripción de los genes en ambos sexos de *S. cerevisiae* se encuentra determinada en tres niveles. El primero tiene que ver con la identidad celular, dada por la presencia del receptor de la feromona del sexo contrario y la síntesis de la feromona del mismo sexo (Bender y Sprague, 1989). En el segundo, la transcripción de los genes sexo específicos depende de la integridad de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento (Hagen *et al.*, 1991). El tercero es la regulación dada por *ScMcm1*; esta proteína es un factor transcripcional que se requiere para la activación de los genes α -específicos por medio de la interacción con $\alpha 1$ y la represión de los **a**-específicos mediante la interacción con $\alpha 2$ (Keleher *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1988; Jarvis *et al.*, 1989; Passmore *et al.*, 1988; Passmore *et al.*, 1989; Ammerer, 1990). *ScMcm1* participa en la activación de los genes en la vía de respuesta a las feromonas mediante el reconocimiento de una secuencia localizada en el promotor de los genes de tipo **a** y la interacción directa con *ScSte12* (Christ y Tye. 1991), mientras que, en células de tipo α , esta interacción, y por lo tanto la transcripción activada por *ScSte12p*, está mediada por la proteína $\alpha 1$ (Yuan *et al.* 1993).

K. lactis tiene también dos tipos sexuales, **a** y α , determinado por el alelo localizado en el locus *Mat* (*Mata* o *Mata*) que cuando se conjugan sexualmente dan como resultado un diploide tipo **a**/ α . *K. lactis* en su locus α contiene tres genes, el $\alpha 1$ y $\alpha 2$, similares a sus contrapartes en *S. cerevisiae*, y un tercero, $\alpha 3$ (Astrom *et al.*, 2000). Tanto *Kla1* como *Kla2* participan de la misma manera en el mantenimiento del tipo sexual de *K. lactis* de la misma forma que *Sca1* y *Sca2* en *S. cerevisiae*. $\alpha 3$ parece también tener la función de participar en este evento, pero de una manera dependiente de la presencia de $\alpha 1$ (Astrom *et al.* 2000). Al parecer, la interacción de *KlSte12* y *Kla1* es importante para la activación de los genes α -específicos. En el trabajo donde se reporta el papel de *KlSte12* en la inducción de genes α -específicos en *S. cerevisiae* se observó que, aunque *KlSte12* era capaz de complementar una mutante de tipo **a** en *S. cerevisiae* que lleva la interrupción de $\Delta Scste12$ cuando se expresaba en un alto número de copias, en las células de tipo α con la interrupción $\Delta Scste12$, el apareamiento sólo podía restituirse cuando se co-expresaba la proteína $\alpha 1$ de *K. lactis*, lo que indica que *KlSte12* no es capaz de interactuar con $\alpha 1$ de *S. cerevisiae* y por lo tanto existe una deficiencia en la interacción con *ScMcm1* (Yuan *et al.* 1993). Esta observación se vió reforzada por la interacción *in vitro* entre *KlSte12* y *Kla1*,

**FALTA
PAGINA**

18

1.4- Papel del gen *Fus1* en la respuesta a feromonas sexuales en *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies.

Uno de los genes cuya transcripción se activa en la respuesta a las feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* es el gen *Fus1* (*ScFus1*). El marco de lectura abierto de *ScFus1* se encuentra localizado en el cromosoma III (Egel, 1994), tiene una longitud de 2111 nucleótidos (McCaffrey *et al.*, 1987) y codifica para una proteína de membrana (*ScFus1*) con un peso de 58 kDa (Trueheart y Fink, 1989). La *ScFus1* es una proteína que presenta un solo cruce transmembranal y que se ubica en la membrana plásmática de las formas conocidas como "shmoo's", principalmente en la zona correspondiente a la punta de la elongación (Trueheart y Fink, 1989). Esta zona es por donde se lleva a cabo la fusión membranar y se establece un puente citoplasmático, por donde se lleva a cabo la fusión de los núcleos, uno de los últimos pasos en el proceso de la fusión celular (Trueheart *et al.*, 1987; Elion, 1995). Se piensa que el extremo amino terminal de *ScFus1* está involucrado en el reconocimiento del sitio de unión célula-célula, ya que las células que expresan una versión de la proteína sin el extremo amino no pueden establecer la fusión membranar al no establecerse el sitio de contacto entre las células haploides (Gammie *et al.*, 1998). La ubicación de *ScFus1* en el sitio de fusión es importante porque determina dónde se van a ubicar las enzimas encargadas de degradar la pared celular en el punto de contacto, el establecimiento de la maquinaria proteica encargada de la fusión membranar y nuclear de los gametos, así como también de la estabilidad de la membrana. En esta parte del proceso de la fusión membranar, el extremo carboxilo terminal juega un papel determinante, ya que células que expresan una versión trunca de *ScFus1* en esta parte de la proteína no pueden establecer el puente citoplasmático necesario para que se fusionen las células, presentan defectos en la fusión de los núcleos y no pueden formar el diploide (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987; Sprague y Thorner, 1992; Elion, 1995). Los trabajos para definir qué parte del extremo carboxilo está involucrada en el despliegue de estas funciones se han enfocado principalmente hacia un dominio llamado SH3, presente en esta parte de *ScFus1* (Rodaway *et al.*, 1989). La función del dominio SH3 no se comprende bien, pero hasta ahora se cree que pudiera mediar el ensamblaje de distintos complejos proteicos mediante la unión de este dominio a proteínas con secuencias ricas en prolina (Noble *et al.*, 1993; Morton y Campbell, 1994). Si esto es cierto, entonces este dominio pudiera ser responsable del establecimiento de las proteínas encargadas de llevar a cabo la fusión membranar (Sprague y Thorner, 1992; Elion, 1995; Moskow *et al.*, 2000). Hasta el momento, sólo se tiene la certeza de que el dominio SH3 presente en el extremo carboxilo terminal de *ScFus1* interactúa directamente con los filamentos de actina (Amberg *et al.*, 1995), que intervienen en la reorganización del citoesqueleto durante la formación del "shmoo" en la respuesta a feromonas de apareamiento.

La secuencia del promotor del gen *Fus1* tiene tres copias de la secuencia TGAAAC y corresponde a la secuencia PRE ("Pheromone Response Element") de *S. cerevisiae* (Trueheart *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1991). Esta secuencia es característica de los genes cuya transcripción se activa por el factor transcripcional ScSte12 únicamente cuando la vía está encendida (Hagen *et al.*, 1991). En el caso del *ScFus1*, se ha caracterizado su respuesta de tal suerte que se le utiliza como reportero para determinar no solo el papel de muchos elementos intrínsecos del sistema, sino también el efecto que tienen elementos de otros

sistemas de transducción heterólogos en la vía (Truheart *et al.* 1987; McCaffrey *et al.* 1987; Trueheart y Fink, 1989).

Se ha reportado la clonación y caracterización de los genes que participan en el proceso de fusión celular de los gametos en otras dos especies y que por ello, se les ha nombrado *Fus1*. El primero se describió en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Petersen *et al.*, 1995). Esta levadura presenta dos tipos celulares: *P*, también llamado *H⁺* y *M*, conocido también como *H⁻*. Ambos tipos sexuales están diferenciados por la expresión del locus MAT, que contiene la información para producir la feromona de su tipo sexual y el receptor para la feromona del sexo contrario (Beach y Klar, 1984). *S. pombe* tiene un sistema de respuesta a feromonas de apareamiento compuesto de MAPKs, homólogo al de *S. cerevisiae* (Davis, 1998; Neiman *et al.*, 1993), con la diferencia que en *S. pombe* la transducción de la señal depende de la proteína Gpa1, que codifica para la subunidad α de la proteína G heterotrimérica acoplada al receptor de la feromona del sexo contrario, y Ras1 (Nielsen *et al.*, 1992). En *S. pombe*, SpGpa1 transduce la señal *via* SpRas1 y este, junto con una proteína llamada Shk1, homóloga a la proteína Ste20 de *S. cerevisiae*, desencadena una cascada de señales a través de tres proteínas cinasas en el siguiente orden: SpByr1 \rightarrow SpByr1 \rightarrow SpSpk1 (Lengeler *et al.* 2000). El proceso de conjugación sexual en esta levadura depende no sólo de la activación de esta vía, sino principalmente de la cascada de señales activada en respuesta a la disminución en los niveles de AMP cíclico causada por la privación de nutrientes en el medio (Lengeler *et al.*, 2000). Estas cascadas activadas en paralelo conducen finalmente a la fosforilación y funcionamiento del factor transcripcional SpSte11, análogo al factor ScSte12 en *S. cerevisiae* (Sugimoto *et al.*, 1991). SpSte11 reconoce una secuencia del promotor conocida como TR, análoga a las secuencias PRE (Yamawaky-Kataoka *et al.*, 1989) y activa la transcripción de los genes involucrados en la fusión membranal y nuclear de los gametos (Lengeler *et al.*, 2000). El proceso de apareamiento en *S. pombe* involucra también la formación de proyecciones celulares y el establecimiento del sitio de fusión en un lugar específico de contacto (Petersen *et al.*, 1995). Un gen de *S. pombe*, transcrito por SpSte11 durante el proceso de apareamiento y que se requiere para la fusión membranal es el *Fus1* (*SpFus1*) (Petersen *et al.* 1995).

La secuencia primaria de aminoácidos de SpFus1 no muestra homología con ninguna proteína conocida. Sin embargo, las células haploides de *S. pombe* que carecen del gen *Fus1* presentan un efecto muy similar en el proceso de apareamiento a las células haploides de *S. cerevisiae* con esta misma mutación: la conjugación se bloquea después de producirse el contacto en el punto de fusión, las paredes celulares no se degradan, impidiendo así el establecimiento del puente citoplasmático y por consiguiente la fusión membranal y nuclear (Petersen *et al.*, 1995). A diferencia de ScFus1, SpFus1 es citoplásmica. Sin embargo, ambas proteínas presentan en su secuencia primaria un dominio capaz de interactuar con el citoesqueleto y con proteínas encargadas de la selección del sitio de fusión celular, además de mediar la formación de complejos multiproteicos involucrados en estos procesos (Truheart *et al.*, 1987; Mayer y Baltimore, 1994; Petersen *et al.*, 1995). Otra característica en común es que ambas proteínas se localizan el ápice de la proyección por donde se llevará a cabo la fusión membranal (Truheart y Fink, 1989; Petersen *et al.*, 1995).

El otro gen *Fus1* se encuentra en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Ferris *et al.* 1996). Esta alga tiene dos tipos celulares, el mt^+ , donde se expresa el gen *Fus1*, y el mt^- , que no lo expresa. La fusión sexual de los gametos de *C. reinhardtii* se lleva a cabo mediante el ensamblaje de las estructuras de apareamiento que se forman durante su diferenciación e involucra la asociación de una estructura, donde se ubica la proteína Fus1, denominada "fleco" (Goodenough *et al.*, 1982). La fusión se lleva a cabo mediante la interacción fleco-fleco de los gametos y la proteína Fus1 del gameto mt^+ (Goodenough *et al.*, 1982; Ferris *et al.*, 1996). Aunque los productos de los genes *Fus1* de *S. pombe* y *C. reinhardtii* probablemente llevan a cabo una función análoga a la del gen *Fus1* de *S. cerevisiae*, sus secuencias genómicas y de aminoácidos no presentan una similitud significativa (Petersen *et al.*, 1995; Ferris *et al.*, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Objetivo

- ¿Cómo debo proceder para hacer la pregunta apropiada, Don Juan?
- Pregunta nada más

“Las Enseñanzas de Don Juan”
Carlos Castaneda.

Los estudios sobre *Kluyveromyces lactis* comenzaron a partir de los años sesenta, principalmente por su importancia en la industria como organismo asimilador de lactosa (Fukuhara *et al.* 1996). A lo largo de todos estos años, esta levadura se ha convertido en un modelo de estudio de células eucariontes alternativo a *S. cerevisiae* (Fukuhara *et al.*, 1996). En general, esto se debe al hecho de que *K. lactis* tiene propiedades fisiológicas muy particulares, distintas a *S. cerevisiae*, y sin embargo, ambas especies tienen elementos en común que participan en los procesos celulares, aunque estos no estén estructurados de la misma forma (Fukuhara *et al.*, 1996). Uno de estos procesos es la respuesta a feromonas de apareamiento en ambas especies. En el laboratorio estamos interesados en definir cuáles son los elementos que conforman la cascada de señales activada por la unión de la feromona del sexo contrario en células haploides de *K. lactis* y conocer la ubicación de los mismos dentro de la vía. Resultados obtenidos por nuestro grupo muestran que, hasta el momento, los elementos conocidos de la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis* son homólogos a los reportados en *S. cerevisiae*. Sin embargo, en *K. lactis* pareciera que la señal es transducida vía la subunidad alfa (*KIGpa1*) de la proteína G heterotrimérica (Saviñón *et al.*, 2001), cuando en *S. cerevisiae* el dímero $\beta\gamma$ (*ScSte4* y *ScSte18*) es el transductor de la señal (Neer, 1995). El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar si el gen *KIFus1* es parte de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*. De ser esto cierto, planteamos como objetivo secundario determinar la relación entre el *KIFus1* y otros dos elementos que conforman la cascada de señales, *KIGpa1* (Saviñón *et al.*, 2001) y *KISte12* (Yuan *et al.*, 1993). Al final, si podemos establecer estas relaciones, podremos proponer un modelo que integre los conocimientos que se tienen de la vía.

3. Materiales y métodos

3.1- Cepas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Escherichia coli

DH5 α . *supE44 lacZ* Δ M15 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Saccharomyces cerevisiae

W3031-A. MAT α . *ade1, ura3, his3, leu2, trp1*.

W3. MAT α . *fus1::Leu2, ade1, his3, leu2, trp1*.

C2. MAT α . *leu2, lys2*.

C2016. MAT α . *fus1::Leu2, lys2*.

Kluyveromyces lactis:

α 155. MAT α . *ade1, his3, ura3*.

12/8. MAT α . *lysA, ura3, arg*.

CXJ1-7A. MAT α . *lac4, ade1, ura3*.

CXL2. MAT α . *lac4, ade1, his3, ura3*

2. MAT α . *fus1::Kan^r lysA, ura3, arg*,

14. MAT α . *fus1::Kan^r, ade1, his3, ura3*.

1.24. MAT α . *ste12::Ura3, lysA, arg*.

309. MAT α . *ste12::Ura3, ade1, his3*.

3.2- Técnicas de ADN recombinante

Los métodos convencionales de ADN recombinante y extracción de ARN utilizados en este trabajo se encuentran reportados en Sambrook *et al.*, 1989. Para el mantenimiento y producción de los plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* (ver "cepas").

3.3- Amplificación de fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa

Todos los fragmentos de DNA descritos en este trabajo, se obtuvieron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de los protocolos descritos en Dieffenbach y Dveksler (Dieffenbach y Dveksler, 1995). En todos los casos se utilizaron cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia a amplificar. El templado para obtener los fragmentos utilizados en las fusiones génicas de *KIFus1* fue el fragmento de 4090 pb que lleva el marco de lectura abierto (ORF) del gen *KIFus1* reportado en este trabajo. Para los demás casos se utilizó como templado DNA cromosomal extraído de la

cepa silvestre 12/8 de *K. lactis*. La Tm utilizada para cada reacción se determinó a partir de la obtenida para cada par de cebadores. En cada caso se seleccionó la banda amplificada en la reacción con menor concentración de Mg⁺⁺. El tiempo de elongación fue determinado por la longitud de la secuencia a amplificar.

3.4- Purificación del ADN

La purificación de ADN del plásmido utilizado en este trabajo se hizo mediante el “kit” QUIaprep^{MR} de acuerdo con las especificaciones del fabricante, a excepción del utilizado para los análisis por restricción de endonucleasas. En estos casos se utilizó la técnica de extracción rápida por “Miniprep” (Lech y Brent. 1987).

El ADN cromosomal de las levaduras se extrajo mediante la técnica de QTP (Hoffman y Winston, 1987).

La purificación de ADN contenido en geles de agarosa se hizo mediante el kit “GeneClean”^{MR} siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.5- Purificación de ARN de levadura

La extracción de ARN total de levaduras se hizo mediante el protocolo de fenol ácido, revisado en la dirección electrónica:
www.fhrc.org/labs/hahn/methods/mol_bio_meth/acidphenol_rna.htm

3.6- Construcciones

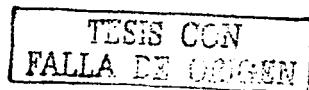
Las construcciones clonadas en plásmidos de replicación autónoma reportadas en este trabajo se esquematizan en las figuras 3 y 4. Las construcciones utilizadas para generar mutantes por recombinación homóloga se encuentran representadas en la figura 5.

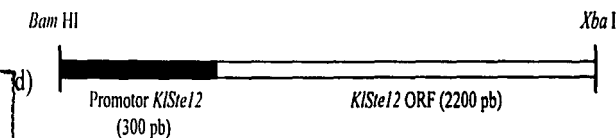
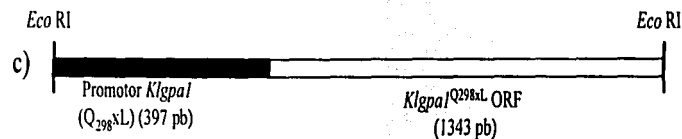
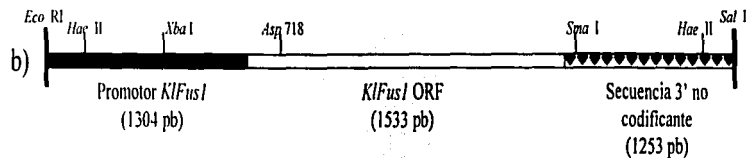
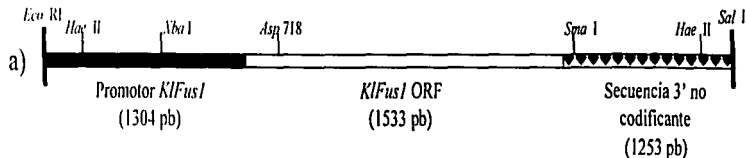
3.7- Transformación de *E. coli*

Se transformaron células competentes de *E. coli* (ver “cepas”) por la técnica de choque térmico (Sambrook *et al.* 1989), y se seleccionaron en medio Lb-ampicilina (60 µg/ml).

3.8- Transfección de las levaduras

Para realizar la transfección de las levaduras se utilizó el método de LiOAc/PEG/DMSO, revisado en Gietz y Woods (2001). Las células transfectadas fueron seleccionadas en medio mínimo SD, con los respectivos aminoácidos. La selección de las células transfectadas con el módulo MX4 (*Kan^r*) (Wach *et al.* 1994) se llevó a cabo en medio rico con una concentración de 200 µg/ml de geneticina.

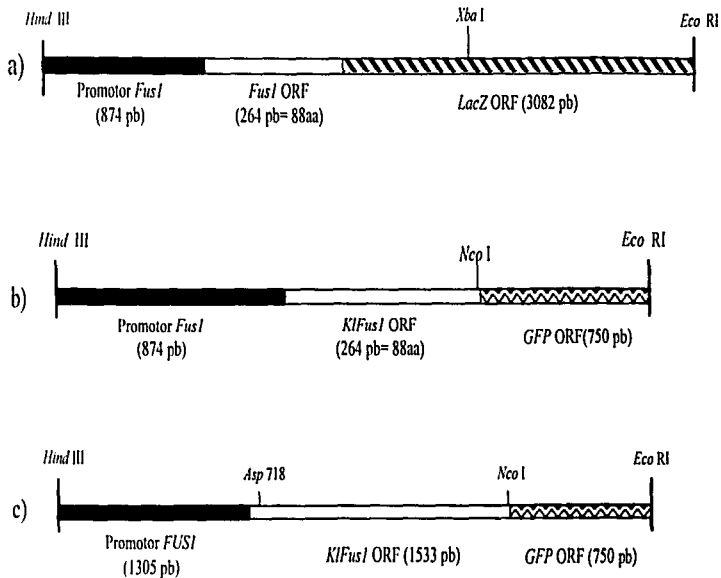




| | OriC | <i>Amp^r</i> | Marcador de auxotrofia | Origen de duplicación de levadura |
|----|------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| a) | + | + | <i>Ura3</i> | <i>KD1</i> |
| b) | + | + | <i>Ura3</i> | 2 μ |
| c) | + | + | <i>His3</i> | <i>KD1</i> |
| d) | + | + | <i>Ura3</i> | <i>KD1</i> |

Figura 3. Construcciones clonadas en plásmidos de replicación autónoma. Los fragmentos completos se encuentran clonados en los sitios señalados en cada extremo. Entre paréntesis se encuentra señalado el tamaño de cada una de sus partes. Las características de cada vector se encuentran resumidas en el recuadro inferior. Los orígenes de duplicación son: *KD1*- *Kluyveromyces drosophylarum* 2 μ - Origen de duplicación para *S. cerevisiae*. a) Fragmento de la clona 112 (4.1 Kb) que contiene el ORF de *KIFus1* b) *KIFus1* clonado en un vector para *S. cerevisiae* c) Alelo *Klgpa1*^{Q298L} d) *KIS12*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

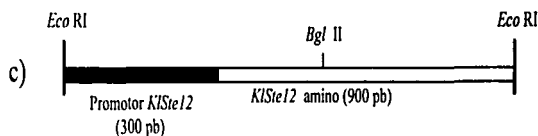
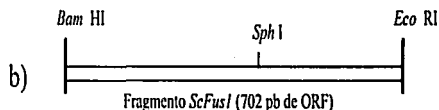


26

| | OriC | <i>Amp^r</i> | Marcador de auxotrofia | Origen de duplicación de levadura |
|----|------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| a) | + | + | <i>Ura3</i> | <i>KD1</i> |
| b) | + | + | <i>Ura3</i> | <i>KD1</i> |
| c) | + | + | <i>Ura3</i> | <i>KD1</i> |

Figura 4. Fusiones génicas del gen *KIFus1* con las secuencias: a) *LacZ* b) y c) *Gfp*. Las fusiones están clonadas en plásmidos de replicación autónoma. Los fragmentos completos se encuentran clonados en los sitios señalados en cada extremo. Entre paréntesis se encuentra señalado el tamaño de cada una de sus partes. Los sitios internos de corte se encuentran representados junto con el nombre de la enzima. Las características de cada vector se encuentran resumidas en el recuadro inferior. Los orígenes de duplicación para todos los casos es el *KD1* de *Kluyveromyces drosophyllum*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



| | OriC | <i>Amp^r</i> | Marcador de auxotrofia | Origen de duplicación de levadura |
|----|------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| a) | + | + | <i>Ura3</i> | - |
| b) | + | + | <i>Ura3</i> | - |
| c) | + | + | <i>Ura3</i> | - |

Figura 5- Construcciones utilizadas para generar mutantes por recombinación homóloga. Los fragmentos se encuentran clonados en los sitios señalados en cada extremo. Entre paréntesis se encuentra señalado el tamaño de cada una de sus partes. Las características de cada vector se encuentran resumidas en el recuadro inferior. Los vectores carecen de origen de duplicación en todos los casos. Los sitios utilizados para linealizar la construcción se encuentran indicados junto con el nombre de la enzima. a) Construcción *Kifus1-Kar1*. b) Fragmento *ScFus1* c) Fragmento *KIS12*

3.9- Apareamientos cuantitativos.

Las células haploides de ambos sexos de la levadura *K. lactis* utilizadas para los apareamientos cuantitativos se crecieron en medio mínimo SD, con los respectivos aminoácidos, toda la noche a 30 °C con agitación a 250 r.p.m. Los ensayos se hicieron con 5 mil células de cada sexo en 100 µl del medio utilizado para crecer el pre-cultivo. Estos cultivos se incubaron durante el tiempo y la temperatura indicados para cada experimento en la sección de “resultados”, en agitación a 250 r.p.m. Posteriormente se plaquearon en medio mínimo selectivo para diploides (SD), se incubaron a 30°C por 24 o 48 horas, dependiendo del tiempo de aparición de colonias.

3.10- Apareamientos cualitativos

Las cepas de interés se estriaron o gotearon en cajas de medio mínimo con los aminoácidos requeridos y se dejaron incubar a 30 °C durante 24 horas. La cepa testigo, previamente crecida en medio mínimo líquido con los requerimientos de aminoácidos necesarios, se plaqueó uniformemente en medio mínimo sólido y se dejó crecer bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que las cepas de interés. Una vez crecidas, las cepas se duplicaron mediante terciopelo a una caja con medio rico. Las células se dejaron aparear durante el tiempo y la temperatura especificada para cada caso en la sección de “resultados”. Transcurrido ese lapso de tiempo, las cajas de duplicaron nuevamente por terciopelo a una caja de medio mínimo selectivo para diploides y se incubaron a 30 °C por 24 o 48 horas, dependiendo del tiempo de aparición de colonias, mismas que posteriormente se contaron.

3.11- Determinación de la actividad de la enzima β-galactosidasa en células haploides transfectadas de levaduras

Las células haploides de *K. lactis* (CXJI-7A y CXL2, ver “cepas”) transfectadas con las construcciones de interés se crecieron en medio mínimo SD toda la noche con sus respectivos aminoácidos, a 30 °C con agitación a 250 r.p.m. Los ensayos se hicieron a partir de un cultivo con 50 millones de células en 1 ml de la feromona del sexo contrario¹. En estos ensayos se utilizaron las células de *K. lactis* con genotipo $\Delta Klac+$, ya que carecen del gen que codifica para la enzima β-galactosidasa endógena de esta levadura (Poch *et al.* 1992) y por lo tanto, al utilizar estas cepas eliminamos la interferencia de su actividad en los resultados de los experimentos.

Los cultivos se incubaron 6 horas a 30 °C en agitación a 250 r.p.m. Para determinar la actividad de la enzima β-galactosidasa se siguió un protocolo modificado, basado en la técnica de Miller (Miller, 1972; Ongay-Larios *et al.*, 2000). El extracto celular (100 µl) se mezcló con 200 µl de una solución de ONPG 4 mg/ml e incubó a 30 °C durante los tiempos especificados en el apartado de “Resultados”. La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¹Por feromona nos referimos al sobrenadante del medio de cultivo centrifugado y filtrado donde previamente se creció una cepa de sexo α (12/8) o de sexo α (α -155), a saturación por 48 horas. Esto se hizo con base en reportes previos que indican que las feromonas de apareamiento se producen constitutivamente y se secretan al medio (Kurjan, 1992; Schrick *et al.*, 1997), en suficiente concentración para provocar la inducción de la cascada de señales. En *S. cerevisiae* se ha probado que la concentración de feromona sexual en el sobrenadante del medio de cultivo es suficiente para que se active el promotor del gen *Fus1* de *S. cerevisiae* (Trueheart *et al.* 1987). En lo que a *K. lactis* concierne, se tienen en el laboratorio mutantes de esta especie de levadura con un fenotipo hipersensible a feromona, y cuando se exponen al medio de cultivo utilizado para crecer una cepa del sexo contrario a saturación, interrumpen su ciclo celular en la fase G₁ y se preparan para la conjugación sexual.

3.12- Paquetería

Los siguientes análisis de secuencia fueron hechos utilizando el sistema experto "Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin":

Secuencias de nucleótidos: Edición, complementación de cadenas, mapeo de sitios de restricción y sitios susceptibles a mutación, diseño de dideoxiloligonucleótidos (tanto específicos como mutagenizados) para reacción de PCR, cálculo de TM de los cebadores, definición del marco de lectura abierto. Comparación de la secuencia de interés contra los bancos de datos global, de plantas y secuencias particulares.

Secuencias de proteínas: Análisis de estructura primaria y secundaria. Comparación de la secuencia de interés contra el banco de datos y secuencias particulares.

Los análisis de la orientación celular de la proteína *K/Fus1*, basados en la estructura primaria, se hicieron mediante los programas de acceso libre TMPred y TMbase localizados en la dirección electrónica http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html (Hofmann y Stoffel. 1993).

Los análisis de los dominios predichos para las estructuras primarias de las proteínas descritas en este trabajo fueron hechas mediante el programa de libre acceso PROSITE localizado en la dirección electrónica <http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html> (Hofmann, *et al.* 1999).

La predicción de la masa molecular se hizo mediante el programa de libre acceso **PeptideMass** localizado en la dirección electrónica <http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html> (Wilkins *et al.* 1997).

El análisis de los sitios de O-glicosilación se hicieron mediante el programa de libre acceso NetOGlyc 2.0 Prediction Server (Hansen *et al.* 1995; Hansen *et al.* 1997; Hansen *et al.* 1998) localizado en la dirección electrónica: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

Los análisis de sitios de unión de factores transcripcionales se hicieron mediante el programa de libre acceso MatInspector™ localizado en la dirección electrónica <http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl> (Quandt *et al.* 1995)

3.13- Microscopía confocal

Las levaduras transfectadas con la proteína verde fluorescente (Gfp) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999) fueron crecidas en medio mínimo selectivo. Las muestras se tomaron a las 24 y 48 horas de crecimiento. Para realizar las observaciones y captura de imágenes se utilizó un equipo de microscopía confocal **BioRad 1024** Láser de Kr-Ar con líneas en 488, 568 y 647 nm, con Microscopio Invertido Nikon TMD 300. Las imágenes fueron procesadas mediante el programa "Confocal Assistant V4.02".

4. Resultados

4.1- Clonación del gen *Fus1* de *K. lactis*.

El gen *Fus1* de *K. lactis* (*KIFus1*) se localizó mediante la hibridación, con una sonda homóloga, de ADN cromosomal cortado con distintas endonucleasas de restricción y transferido mediante la hibridación ADN-ADN (fig. 6). La sonda homóloga se amplificó por PCR utilizando un par de cebadores de 18 nucleótidos diseñados a partir de las posiciones 79 y 819 de la secuencia reportada en el banco de datos (número de acceso: AL427517) (Bolotin-Fukuhara, *et al.* 2000). Esta secuencia contiene 274 pb que codifican para la parte final de un marco de lectura de 90 residuos de aminoácidos, que presenta el porcentaje más alto de similitud (58.8%) e identidad (51.1%) con el extremo carboxilo de ScFus1 al compararla contra el banco de datos de proteínas (Swissprot) utilizando el algoritmo de Needleman and Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970).

Con la zona alrededor de las 4 Kb (fig. 6), que corresponde al carril que contiene el ADN cortado con la endonucleasa de restricción *Hind* III, se hizo un minibanco genómico. Se hibridaron 200 colonias con la sonda homóloga de *KIFus1*. De estas, se seleccionaron dos clonas que dieron señal positiva, la 112 y la 812 (fig. 7). El ADN del plásmido purificado a partir de las clonas 112 y 812 se analizó mediante cortes con endonucleasas de restricción y el gel fue transferido a membrana de nylon e hibridado nuevamente con la sonda homóloga del gen *KIFus1*. De este análisis se concluyó que el fragmento que contiene el marco de lectura abierto (ORF) del *KIFus1* tiene un tamaño aproximado de 4.21 Kb y está contenido en las dos clonas, sólo que con distinta orientación.

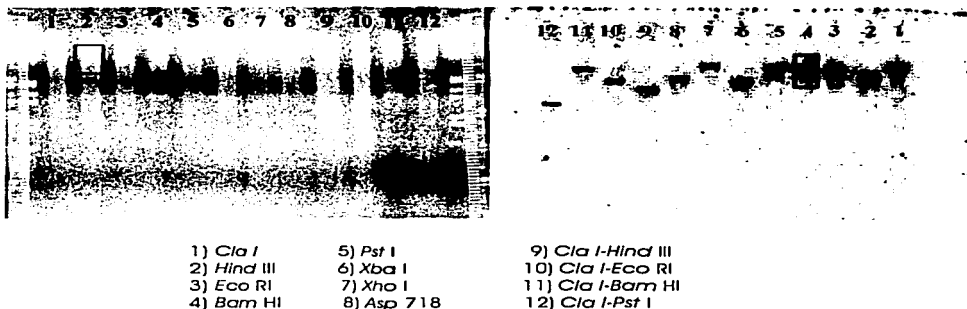


Figura 6. Hibridación de transferencia tipo "southern" de ADN cromosomal de *K. lactis* cortado con distintas enzimas de restricción. Las endonucleasas utilizadas están representadas en cada uno de los carriles. La zona delimitada fue clonada en un banco genómico.

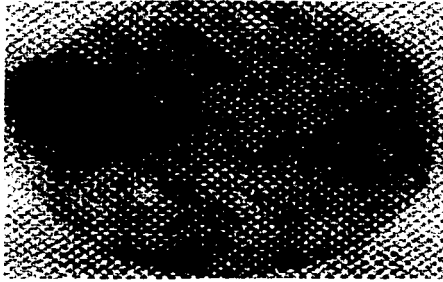


Figura 7. Búsqueda por tamizaje del gen *KIFus1* en clones del banco genómico. Se muestran las dos clones positivas (112 y 812) de 200, obtenidas a partir de la hibridación con la sonda homóloga del gen.

4.2- Análisis teórico del gen *Fus1* de *K. lactis*.

La secuencia del fragmento *Hind* III-*Hind* III contenido en la clona pf112 (*KIFus1*) está reportada en el banco de datos con el número de acceso AF519444 (fig. 8). Tiene un tamaño de 4089 pb en el cual está presente un marco de lectura abierto de 1533 pb, que codifica para una proteína de 510 residuos de aminoácidos (*KIFus1*) (fig. 8) con un peso molecular teórico de 57 kD. La secuencia de nucleótidos se comparó con el banco de datos "Genebank". Para comparar las secuencias de nucleótidos se utilizó el algoritmo de Needleman and Wunsch (Needleman y Wunsch. 1970). El resultado mostró una identidad del 45% con la secuencia del gen *ScFus1*, mientras que la comparación de la secuencia primaria contra el banco de datos "Swissprot" reveló que la secuencia mas parecida a la proteína *Fus1* de *K. lactis* (*KIFus1*) es la de la proteína *Fus1* de *S. cerevisiae* (*ScFus1*), con una identidad del 32.8% y una similitud del 39.8% (fig. 9). La mayor identidad entre ambas secuencias primarias (63%) la encontramos en la parte que corresponde al extremo carboxilo teminal (fig. 9) donde *ScFus1* presenta un dominio SH3 (Amberg *et al.* 1995).

LOCUS AF519444 4089 bp DNA linear
 DEFINITION Kluyveromyces lactis Fus1 protein (Fus1) gene, complete cds.
 ACCESSION AF519444
 VERSION AF519444.1 GI:21686523
 KEYWORDS -
 SOURCE Kluyveromyces lactis.
 ORGANISM Kluyveromyces lactis
 Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae;
 Kluyveromyces.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4089)
 AUTHORS Lloret, A., Savinon-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Mendoza, V.,
 Tenorio, E. P. and Coria, R.

TITLE The Fus1 gene is required for proper haploid mating and its
 expression is enhanced by the active form of the G-alpha (Gpal) subunit
 involved in the pheromone response pathway of the yeast Kluyveromyces
 lactis

JOURNAL Unpublished
 TITLE Direct Submission
 Submitted (06-JUN-2002) Genetica Molecular, Instituto de Fisiologia
 Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Ciudad Universitaria
 Ap. Postal 70-242, Mexico City, DF 04510, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..4089
 /organism="Kluyveromyces lactis"
 /db_xref="taxon:28985"
 gene <1305..>2837
 /gene="Fus1"
 mRNA <1305..>2837
 /gene="Fus1"
 /product="Fus1 protein"
 CDS 1305..2837
 /gene="Fus1"
 /function="required for proper haploid
 mating"
 /codon_start=1
 /product="Fus1 protein"
 /protein_id="AAM74941.1"
 /db_xref="GI:21686524"

/translation="MEIETETRTVIQTQMNELILHNEATVINTIYVDQYRASNTLPYALT TVSTAF
 ATQLKNVKTATITNQVTTTIETSQESTSTSSSTSHSSSSSLGVQSSQSARMTSGISLNSLASTSDGKN
 TSGTILGLAIGLPIALFVVG LGIVFGFLY YRRFHSKVD PDNENMQQHEPDSVLGKLYGMQELNDLKK
 AELFNEKKQDEKYDSGVSSKIT YKVS KPYISHPELIQTPEKLAFTDNPYRKNV NQKSDTNAYSNSTM
 DLGQFPRPLASPFKKWNYESPLSRWFLTKSTLIQDKIQTAKTPTIHLKQLNILARANKSKITINGEE
 PYTEMS PMLPSVPRS PYEAT ELSPLSELKEESEI PINESKIRTEQGVKPP I IDTNLKP TYPTLLKL
 DKLSKTKPLPKPPNPHFTSANDDQHVSDNVSARSDDHDLRSARKSTAEQAKLYRVVKDYQVLMDEI
 DIRGELV RVLARHTD GWCLVERSNIQN HSSLDGPTYL NENRGIVPGLCLQESM"

Figura 8. Hoja de identificación del banco de datos correspondiente a la secuencia obtenida del fragmento de 4089 pb de la clona pf112. El ORF va del nucleótido 1305 al 2837 y su traducción se encuentra entre comillas al final de la hoja.

KlFus1 MEIETETRTVIQTQMNELILHNEATVINTIYVDQYYRASNTLPYALTIVSTAFATQLNKNVKTATITNQVTTTIETSQESTSTSSTSHSS (90)
 ScFus1 MVATIMQTTTTVLTTVAAMSTTLASNYISSQASSSTSVTTVTT (43)
 * * * * *

KlFus1 SSLGVQSSQSARMTSGISLNSLASTSDGKNSTSGTILGLAIGLPIALFVVGIGVFGFLYRRFHSKVD..PDNENMQQHEP...DSVLG (174)
 ScFus1 IATSIRSTPPSNLLFSNVA.....AQPKSSSASTIGLSIGLPIGIFCGLLILLCYFYLRKNSVSIINPPMSATIPREEEYCRRTNWS (126)
 * * * * *

KlFus1 KLYGMQELNDLKK.AELFNEKQDEKYDSG..VSSKITVYKSKPYISHPELIQTPEKLAFTDNPYR.KNVNQSDTNAY.SNSTMDLGQF (260)
 ScFus1 RLFWSQKCEDQNSYSNRDIEKYNDTQWTSGDNMSSKIQYKISKPII..POHILTPKTKVKNPYAWSGNKISLDPKVNEMEEKVVDAFLY (214)
 * * * * *

KlFus1 PRP.....LASPFKKWNYESPLSRWFLTKSTLIQD...KIQTAKTPT..IHLKQLNILARANKSKITI (317)
 ScFus1 TKPPNIVHIESSMPSYNDLPSQKTVSSKKTALKTSEKWSYESPLSRWFLRGSTYFKDYGLSKTSLKTPTGAPQLKQMKLSRISKGYFNE (304)
 * * * * *

KlFus1 NGEOPYTEMSPLP..SVPRSPYEAIESL...PSLELKEESEIPINESKIRTEQ...GVIPQIIDTNLKPTYPTLLKLDKLSKTKPLP (398)
 ScFus1 SDIMP.DERSPILEYNNTPLDANDSVNNGTTPDPSQITSYRNNDLITARPHSVIYGTTAQQTLETNFDHHDCKSTEKHELIPTP (392)
 * * * * *

KlFus1 KPPNPHFTSANDD...QHVSNDVSARSDDHDLRSARKSTAQEQ.AKLYRVVKDYQAVLMDEIDIRGGELVRLARHTDGCWCLIVERSNIQN (484)
 ScFus1 SKPLKRRKRRQSKMYQHLQHLRSKPLPLTPNSKYNGEASVQLGKTYTVIQDYEPRLTDEIRISLGEKVKILATHTDGCWCLIVEKCNTOK (483)
 * * * * *

KlFus1 ...HSSLDGPTYLNENRGIVPGLCLQESM (510)
 ScFus1 GSIHVSVDKRYLNEDRGIVPGDCLQEYD (512)
 * * * * *

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Comparación entre las secuencias primarias de las proteínas Fus1 de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Los asteriscos representan las identidades encontradas, la barra negra indica la posición del cruce transmembranal en ambas proteínas. El recuadro indica la posición del dominio SH3.

A pesar de que las secuencias primarias de *ScFus1* y *K/Fus1* tienen una baja identidad (38.2%), el perfil de hidropatía basado en el algoritmo de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) (fig. 10) reveló que *K/Fus1* presenta un cruce transmembranal de 24 residuos de aminoácidos, que comprende del residuo 126 al residuo 150, dejando un extremo amino de 125 residuos de aminoácidos y un extremo carboxilo de 360 residuos de aminoácidos. Este mismo perfil lo encontramos en *ScFus1*, el cual presenta un solo cruce transmembranal de 25 residuos de aminoácidos (Trueheart y Fink, 1989).

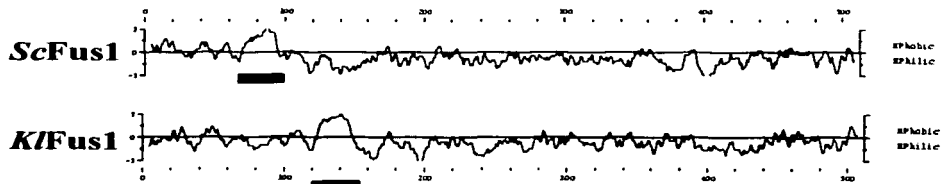
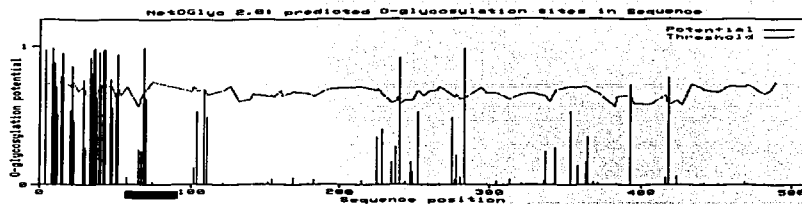


Figura 10. Perfil de hidropatía de las proteínas Fus1 de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. La barra negra representa la posición del cruce transmembranal.

Mediante la comparación de los patrones de migración en gel de *ScFus1* (80kD) contra el peso molecular teórico (58 kD), así como también de la diferencia en el peso molecular de esta proteína en mutantes de la vía de secreción en *S. cerevisiae*, se llegó a la conclusión de que esta proteína se glicosila en su extremo amino a lo largo de su tránsito por esta vía (Trueheart y Fink, 1989). Por experimentos hechos con células haploides de *S. cerevisiae* inducidas con feromona en presencia de tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación de las proteínas y de la purificación de *ScFus1* a partir de cultivos crecidos en presencia de manosa marcada radioactivamente, se comprobó que en *ScFus1* los residuos de serinas y treoninas del extremo amino se encuentran O-glicosilados (Trueheart y Fink, 1989). El extremo amino de la proteína *K/Fus1* es rico en serinas y treoninas (40 de 126 aa) y se encuentra seguido de un cruce transmembranal (fig. 10), al igual que la secuencia del extremo amino de *ScFus1* (33 serinas y treoninas de 71 aa) (Trueheart y Fink, 1989). Para saber si las serinas y treoninas presentes en la secuencia de *K/Fus1* pudieran ser blancos potenciales de glicosilación hicimos una predicción mediante el programa NetOGlyc 2.0 (Hansen *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1998). En la figura 11 observamos que efectivamente las serinas y treoninas del extremo amino de *K/Fus1* son sitios potenciales de O-glicosilación, al igual que lo reportado para *ScFus1*.

ScFus1



K/Fus1

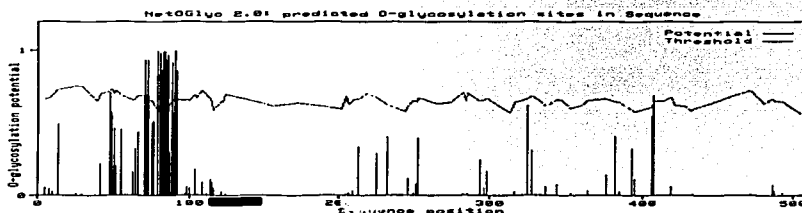


Figura 11. Presencia de sitios potenciales de glicosilación en las proteínas Fus1 de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. El grado de susceptibilidad de los sitios en la estructura primaria está indicado en la gráfica y representado por medio de las barras grises. La barra negra indica la posición del cruce transmembranal.

Los ensayos de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular de las células haploides inducidas con feromona de *S. cerevisiae* que expresan una fusión *ScFus1::LacZ* mostraron que *ScFus1* se localiza en la membrana celular, preferentemente en la punta de la proyección (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987). Mediante ensayos de protección a proteasa se pudo establecer que *ScFus1* orienta su extremo amino hacia el periplasma y el carboxilo hacia el interior celular (Trueheart y Fink, 1989). Para comparar la orientación celular teórica entre ambas proteínas hicimos la predicción de la orientación de *K/Fus1* mediante el programa TMPred (Hofmann y Stoffel, 1993). En la figura 12 observamos que *K/Fus1* presenta una fuerte tendencia a dirigir su extremo amino terminal hacia el periplasma, mientras que el extremo carboxilo, que contiene el dominio putativo SH3, permanece en el citoplasma de la célula. Se piensa que el dominio SH3 de *ScFus1* sirve como mediador para el ensamblaje de complejos proteicos encargados de llevar a cabo el remodelamiento del citoesqueleto para formar las proyecciones celulares y también para la localización de la maquinaria que se encarga de llevar a cabo la fusión membranal y nuclear de los parentales durante el proceso de apareamiento. El hecho de que encontremos un dominio potencial de tipo SH3 en la secuencia primaria de *K/Fus1* justamente en la zona donde existe el mayor porcentaje de identidad en el extremo carboxilo entre *K/Fus1* y *ScFus1*, pudiera sugerirnos una función similar para ambas proteínas.

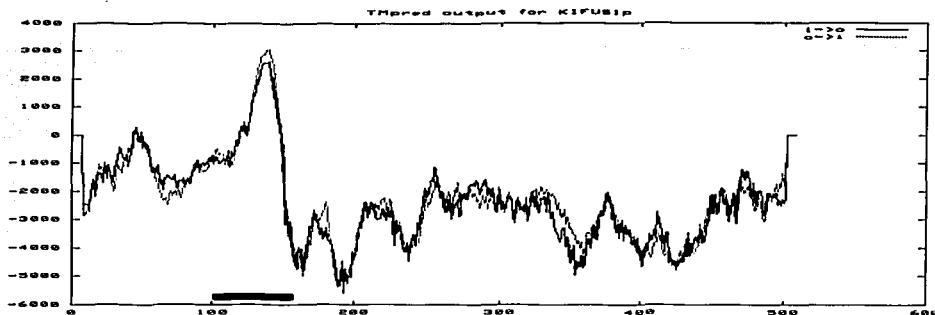


Figura 12. Predicción de la orientación de la proteína *KIFus1*. La escala del eje Y es arbitraria y muestra la probabilidad de los aminoácidos de estar orientados hacia el exterior o el interior celular. El eje X muestra la posición de los residuos de aminoácidos en la secuencia primaria. La barra muestra la posición del cruce transmembranaral. La línea punteada muestra la probabilidad de que la proteína esté orientada de fuera hacia dentro y la línea continua muestra la probabilidad de que la proteína esté orientada de dentro hacia fuera.

Con los datos anteriores podemos decir que el gen que tenemos clonado es el *KIFus1*, el cual teóricamente presenta, dentro de su secuencia primaria los mismos dominios que *ScFus1*. Sin embargo, requerimos de otra serie de experimentos para probar su función en la cascada de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*.

4.3- Papel del *KIfus1* en el apareamiento celular

Uno de los genes que participa específicamente en el proceso de la fusión membranal y nuclear en *S. cerevisiae* es *Fus1*. Las células haploides de *S. cerevisiae* que carecen de *Fus1* presentan una interrupción en el proceso de apareamiento justo antes de la fusión citoplasmática (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987; Sprague y Thorner, 1992). Las cruza entre parentales que carecen del *Fus1* presentan una disminución en la formación del diploide, sin que tengan un fenotipo de esterilidad total (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987). Esto se debe al hecho de que otro de los genes involucrados en la fusión celular, específicamente en la fusión nuclear de los gametos, llamado *ScFus2*, es capaz de sustituir la función de *ScFus1* (McCaffrey *et al.*, 1987).

Con la finalidad de determinar experimentalmente el papel del gen *Fus1* de *K. lactis* en la conjugación celular, se generaron mutantes $\Delta KIfus1$ de ambos sexos (α y α) por recombinación homóloga del módulo MX4 (Wach *et al.*, 1994), que confiere resistencia a geneticina (fig. 5a) flanqueado por dos fragmentos de *KIfus1*. El primero abarca del nucleótido -1217 al +371 y el segundo abarca del nucleótido +1505 al +2735. El resultado del proceso de recombinación es la eliminación de 1257 pb de la secuencia promotora y la totalidad del marco de lectura abierto. El genotipo de las clonas resistentes a geneticina se comprobó mediante la hibridación homóloga de una transferencia tipo "Southern". De estas clonas se seleccionaron una cepa de sexo α y una cepa de sexo α para llevar a cabo los experimentos de apareamiento para probar si la interrupción de *KIFus1* tiene algún efecto en el apareamiento. Esto se hizo pensando en la posibilidad de que pudiera variar dependiendo de si se presenta en uno o ambos parentales, ya que en *S. cerevisiae* se ha reportado que la interrupción en uno solo de los parentales no afecta el proceso de apareamiento (Trueheart *et al.*, 1987).

Se ha reportado que los apareamientos entre las células haploides de *S. cerevisiae* que carecen del *ScFus1* se ven afectados por la temperatura a la cual se lleven a cabo (Elion *et al.*, 1995). El apareamiento entre cepas de ambos sexos carentes del *ScFus1* disminuye 38 veces al realizarlo a 14 °C, comparado contra el mismo apareamiento realizado a 30 °C, ya que la temperatura es un factor que afecta el proceso de fusión de vesículas fosfolipídicas *in vitro* (Elion *et al.*, 1995). Debido a esto, quisimos probar si, en caso de que *KIFus1* participe en la fusión celular, este proceso se vea alterado por la temperatura en células que carecen de él.

Se realizaron los siguientes apareamientos a 30 y 14 °C en medio rico por 4 horas: *KIfus1* x *KIfus1*, $\Delta KIfus1$ x *KIfus1* y $\Delta KIfus1$ x $\Delta KIfus1$. En el resultado de este experimento (fig. 13) observamos una reducción en la formación de diploides en la cruce $\Delta KIfus1$ x *KIfus1* respecto a la cruce *KIfus1* x *KIfus1*, siendo todavía más drástica en la cruce $\Delta KIfus1$ x $\Delta KIfus1$. Esta reducción en el apareamiento se observó en ambas condiciones de temperatura, a diferencia de lo reportado en los apareamientos entre una cepa $\Delta Scfus1$ x *ScFus1*, donde la diferencia en la formación de diploides no se puede apreciar de manera cualitativa durante las 4 horas de apareamiento utilizadas por nosotros en las cruces de *K. lactis*.

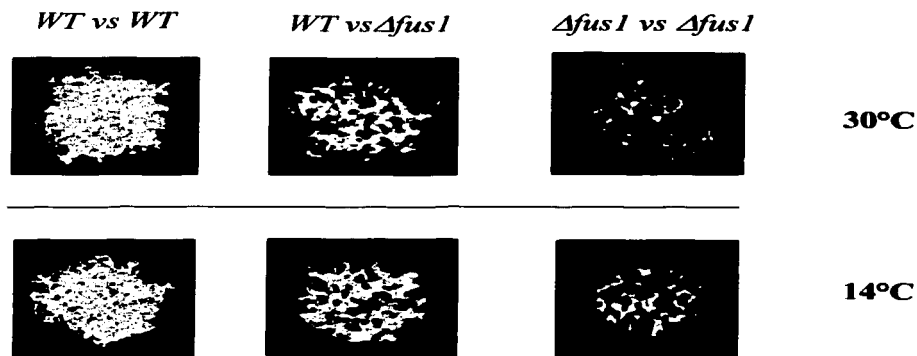


Figura 13. Formación de diploides a partir de las cruces de la cepa $\Delta Kifus 1$. Los diploides fueron seleccionados en medio mínimo SD sin aminoácidos. Las cruces se encuentran indicadas en la parte superior y la temperatura a la que se realizaron está indicada en la columna del lado derecho. Los diploides se fotografiaron a las 24 horas de incubación a 30°C.

Con el fin de tener una medida del efecto de la mutación en el *KIFus1* hicimos los mismos apareamientos en forma cuantitativa. Los resultados se muestran en la tabla 1 y figura 14. En ella podemos observar que en el apareamiento $\Delta Kifus1 \times KIFus1$ a 30 °C (fig. 14a) se registró una disminución de 1.2 veces (18.6%) en el número de diploides respecto a los diploides obtenidos del apareamiento entre las cepas silvestres, mientras que en el apareamiento $\Delta Kifus1 \times \Delta Kifus1$ se observó una disminución de 6.7 veces (85%) respecto a las silvestres. En el apareamiento $\Delta Kifus1 \times KIFus1$ a 14°C (fig. 14b), se observó una disminución de 1.2 veces (18.2%) en el número de diploides obtenidos respecto a la cruce entre las cepas silvestres, mientras que en el apareamiento $\Delta Kifus1 \times \Delta Kifus1$ se observó una disminución en el número de diploides de 6.7 veces (33.4%) respecto a las silvestres.

Estos resultados muestran que durante el apareamiento, la ausencia de *KIFus1* en uno de los parentales afecta negativamente el proceso para la formación del diploide, y esta disminución se aprecia de manera más drástica cuando el *KIFus1* se encuentra ausente en ambos parentales, por lo que es claro que el *KIFus1* se requiere para la conjugación sexual. El efecto de la disminución de la temperatura durante el proceso de apareamiento pareciera estar relacionado con el proceso general de fusión celular, aparte del hecho de afectar directamente a la fusión de las membranas lipídicas de las células, función la que, teóricamente, es llevada a cabo por *KIFus1*. Esta hipótesis está basada en la observación de que el proceso de apareamiento se ve afectado por la temperatura no solo en las cruces donde uno o ambos parentales tengan el genotipo $\Delta Kifus1$, sino que también se tiene una diferencia 5.8 veces en el número de diploides obtenidos a 14°C que a 30°C, a partir de las cruces entre los parentales con genotipo silvestre.

| Cruzas | 30 °C | Porcentaje de apareamiento | 14 °C | Porcentaje de apareamiento |
|--|-------------|----------------------------|---------|----------------------------|
| <i>KIFus1</i> vs <i>KIFus1</i> | 190.0± 64.6 | 100 | 33± 4.8 | 100 |
| Δ <i>KIfus1</i> vs <i>KIFus1</i> | 154.8± 26.9 | 81.4 | 27± 9.2 | 81.8 |
| Δ <i>KIfus1</i> vs Δ <i>KIfus1</i> | 28.6± 7.1 | 15.0 | 22± 5.3 | 66.6 |

Tabla 1. Cruzas cuantitativas de la cepa Δ *KIfus1* a distintas temperaturas. Los apareamientos se hicieron por 4 horas a la temperatura señalada en las columnas. El número indicado a la tabla corresponde al promedio de un quintuplicado de los diploides seleccionados en medio mínimo SD sin aminoácidos. Aquí se presentan con su respectiva desviación estandar. Los datos se encuentran graficados en la figura 14.

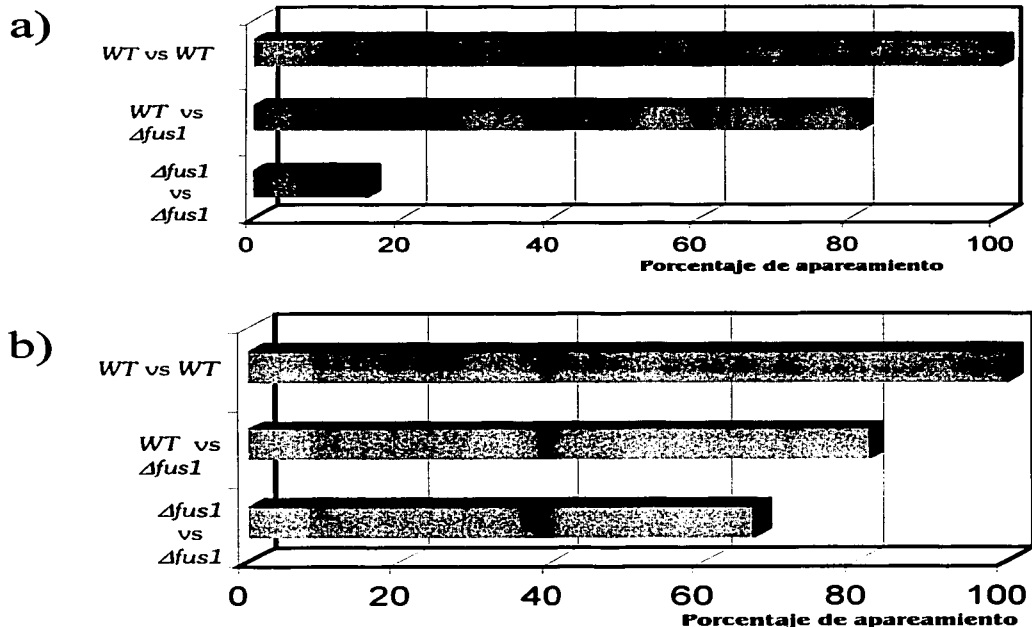


Figura 14. Cruzas cuantitativas de la cepa Δ *KIfus1*: a)30°C b)14°C. Los valores se encuentran representados en porcentaje de formación de diploides de cada una de las cruzas, tomando como el 100% el promedio obtenido de la cruce entre las cepas silvestres.

4.4- Complementación de una mutante $\Delta Scfus1$ de *S. cerevisiae* con el gen *KIFus1*

Hasta este punto sólo habíamos podido establecer semejanzas teóricas entre *KIFus1* y *ScFus1*, así como plantear la posibilidad de que *KIFus1* se requiere para la formación de diploides en *K. lactis* durante el proceso de la fusión celular. Para fortalecer la idea de que *KIFus1* participa en el proceso de fusión membranal decidimos probar su función en la mutante $\Delta Scfus1$ de *S. cerevisiae*, que obtuvimos por recombinación homóloga del fragmento representado en la figura 5b. Basándonos en la caracterización extensiva que se ha hecho de *ScFus1* (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987; Trueheart y Fink, 1989; Elion *et al.* 1995) y en el hecho de que la complementación en mutantes de *S. cerevisiae* ha permitido el aislamiento de genes homólogos de *K. lactis* decidimos probar si *KIFus1* (fig. 3b) puede complementar a una mutante $\Delta Scfus1$. Esta estrategia es altamente efectiva para establecer homologías en la función de proteínas que participan en los procesos de ambas especies (Fukuhara *et al.* 1996). Con esto podríamos establecer específicamente la función de esta proteína en la fusión membranal de las células parentales durante el proceso de conjugación sexual.

Se hicieron los siguientes apareamientos cualitativos de una cepa $\Delta Scfus1$ a 14 °C durante 4 horas: $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1$, $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1 + KIFus1$ y $ScFus1 \times \Delta Scfus1$. Los apareamientos se hicieron a esta temperatura porque se ha reportado que una cruz $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1$ a 14 °C presenta una reducción en la formación de diploides 26.4 veces menor respecto a una cruz *ScFus1* \times $\Delta Scfus1$, debido al efecto que tiene la temperatura sobre el proceso de fusión membranal (Elion *et al.*, 1995). El resultado de la figura 15 muestra un mayor número de diploides formados a partir de la cruz $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1 + KIFus1$ que los obtenidos en la cruz $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1$ respecto al apareamiento de *ScFus1* \times $\Delta Scfus1$. Con el fin de tener la medida de la complementación de la mutante $\Delta Scfus1$, aparentemente causada por el efecto de *KIFus1*, hicimos los mismos apareamientos de manera cuantitativa.

En la tabla 2 se encuentran los datos representados en la figura 16. La mutante $\Delta Scfus1$ con el *KIFus1* presentó una disminución de 1.4 veces (32.7%) respecto a la cruz *ScFus1* \times $\Delta Scfus1$, mientras que la cruz $\Delta Scfus1 \times \Delta Scfus1$ presentó una disminución de 2 veces respecto a la cruz *ScFus1* \times $\Delta Scfus1$ (49.9%). La diferencia entre la formación de los diploides obtenida para la cepa $\Delta Scfus1$ y la causada por la presencia del *KIFus1* en la mutante $\Delta Scfus1$ fue de 0.6 veces. Con este dato, podemos pensar que si bien existe una complementación de la función de *ScFus1* en la mutante $\Delta Scfus1$ por parte de *KIFus1*, esta no es total. Esta complementación incompleta pudiera deberse a que en los extremos amino terminales se encuentra la zona con menor identidad entre *ScFus1* y *KIFus1* (21.2%), aunque teóricamente ambos extremos comparten los mismos sitios de glicosilación. La baja identidad que comparten ambos extremos pudiera ser responsable de esta diferencia entre los apareamientos de la cepa $\Delta Scfus1$, con y sin el *KIFus1*, contra la cepa $\Delta Scfus1$ respecto al apareamiento de la cepa *ScFus1* con la cepa $\Delta Scfus1$. Es posible que el extremo amino de *Fus1* en ambas especies esté relacionado con el reconocimiento interespecífico célula-célula, función que al parecer lleva a cabo extremo amino de *ScFus1*. En primer lugar este extremo está orientado hacia el exterior celular y por lo tanto se piensa que establece

contacto con la célula del sexo contrario y en segundo lugar se ha reportado que células que expresan una versión trunca de *ScFus1* en este extremo presentan defectos en su apareamiento (Trueheart y Fink, 1989).



Figura 15. Formación de diploides obtenidos a partir de la cruce de la cepa $\Delta Scfus1$ de *S. cerevisiae* contra una cepa $\Delta Scfus1$ de sexo contrario. Las cruces están indicadas en la parte superior, se hicieron durante 4 horas a 14°C contra una cepa $\Delta Scfus1$ del sexo contrario. Los diploides fueron seleccionados en medio SD sin aminoácidos y fotografiados después de 24 horas de incubación a 30°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| Cruzas | Formación de diploides a 30 °C | Porcentaje de apareamiento a 30°C | Formación de diploides a 14 °C | Porcentaje de apareamiento a 14°C |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| $\Delta Scfus1$ vs $\Delta Scfus1 + KIFus1$ | 1813.7 ± 103.1 | 99.2 % | 1034.4 ± 152.7 | 67.3 % |
| $\Delta Scfus1$ vs $\Delta Scfus1$ | 1762.4 ± 275.9 | 96.4 % | 770.0 ± 229.2 | 50.1 % |
| $\Delta Scfus1$ vs $ScFus1$ | 1827.7 ± 157.3 | 100.0 % | 1535.3 ± 389.7 | 100.0 % |

Tabla 2. Cruzas cuantitativas de la cepa $\Delta Scfus1$ a distintas temperaturas. Las cruzas se hicieron por 4 horas a la temperatura señalada en las columnas. El número indicado en la tabla corresponde al promedio de un triplicado de los diploides seleccionados en medio mínimo SD sin aminoácidos. Aquí se presentan con su respectiva desviación estandar.

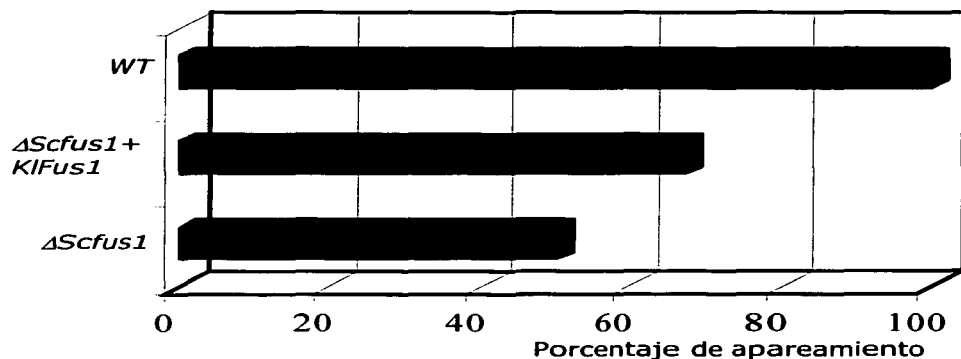


Figura 16. Apareamientos cuantitativos de la cepa $\Delta Scfus1$ a 14 °C. Los valores se encuentran representados en porcentaje de formación de diploides de cada una de las cruzas, tomando como el 100% el promedio del quintuplicado del número de diploides obtenido de la cruce $\Delta ScFus1 \times \Delta Scfus1$. Todas las cepas fueron apareadas contra la mutante $\Delta Scfus1$ de sexo contrario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.5- Actividad transcripcional del *KIFus1* en respuesta a feromonas de apareamiento

En este punto del trabajo pudimos sugerir que *KIFus1* es un elemento que interviene en el apareamiento celular, y que probablemente está involucrado en la fusión membranal de los gametos, pero no habíamos determinado su pertenencia al sistema de respuesta a feromonas de apareamiento. El *Fus1* de *S. cerevisiae* fue definido como un elemento inducible por feromonas sexuales debido a que en las células haploides de *S. cerevisiae* tratadas con feromona de tipo sexual contrario, el *ScFus1* se transcribe cerca de 50 veces más (McCaffrey *et al.*, 1987). Este nivel transcripcional está determinado por la activación integral de la vía, ya que cualquier falta y/o deficiencia en la función de los elementos que la forman tiene un efecto sobre el mismo. Debido a esto se han utilizado distintas fusiones génicas del promotor del gen *ScFus1* con secuencias cuyos productos tengan una actividad fácilmente cuantificable (i.e. *LacZ* de *E. coli*) lo que le ha valido el papel de reportero para este proceso (Trucheart *et al.*, 1987; Sprague y Thorner, 1992).

Para probar si *KIFus1* pudiera definirse como un elemento de respuesta a las feromonas de apareamiento tomando como base el mismo criterio utilizado para definir al *ScFus1* como tal, utilizamos células haploides de *K. lactis* de tipo α transfectadas con una construcción. Esta comprende: 874 pb del promotor del gen *KIFus1* y 264 pb del marco de lectura abierto que codifican para los primeros 88 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal, fusionado en fase con el marco de lectura abierto del gen *LacZ* de *E. coli* (3082 pb), que codifica para la enzima β -galactosidasa (*KIFus1-LacZ*, fig. 4a). El fragmento correspondiente al *KIFus1* en esta construcción se obtuvo a partir de PCR, utilizando un par de deoxiligonucleótidos de 18 y 37 nucleótidos diseñados a partir de los sitios sitio -1324 y +264 respectivamente. El cebador de 37 nucleótidos lleva dos cambios silentes en la secuencia que generan un sitio de restricción *Xba* I y un sitio *Nco* I, que permiten la integración en fase tanto del *LacZ* como de secuencia de la *Gfp*, de la que se hablará más adelante

Las células transfectadas se incubaron en presencia de feromona de tipo α y feromona de tipo α , y posteriormente cuantificamos la actividad transcripcional de esta fusión. Los resultados pueden verse en la tabla 3 y figura 17. En ella podemos observar que la actividad transcripcional del gen *KIFus1* aumentó aproximadamente 7.2 veces en presencia de la feromona del tipo sexual contrario (α), respecto a la actividad que tiene en ausencia de la misma. Estos datos indican que *KIFus1* es un elemento que aumenta su nivel de transcripción en células haploides de *K. lactis*, en presencia de la feromona del sexo contrario, tal y como ocurre con el *ScFus1* en *S. cerevisiae*. Por lo tanto, *KIFus1* puede ser definido como un elemento de respuesta a feromonas en *K. lactis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| Construcción | 0 horas | 6 horas |
|--------------------|--------------|------------|
| <i>KlFus1-LacZ</i> | 28.4±4.3 | 203.9±27.5 |
| <i>LacZ</i> | Indetectable | 53.6±17.5 |
| Vector | 12.1±2.5 | 92.7±1.0 |

Tabla 3. Actividad transcripcional del promotor del gen *KlFus1* de células haploides de *K. lactis* en presencia de feromona de apareamiento del sexo contrario. La inducción se hizo por 6 horas. Los valores están representados en unidades/mg proteína/ml y son el promedio del experimento realizado por quintuplicado. Aquí se presentan con su respectiva desviación estándar. Los valores obtenidos con la feromona del mismo sexo son semejantes a los que se presentan en la columna de tiempo cero, por lo que no se muestran en la tabla.

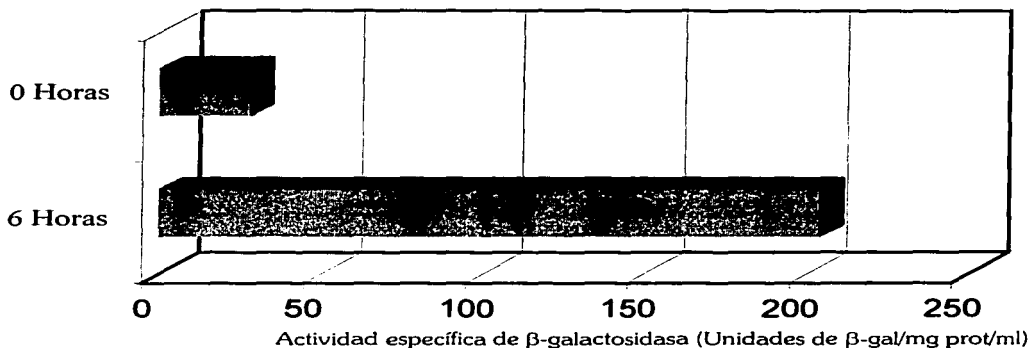


Figura 17- Actividad transcripcional del gen *KlFus1* en respuesta a feromonas de apareamiento. Las barras muestran la actividad del promotor del gen *KlFus1* expuestas a la feromona del sexo contrario por el tiempo indicado. Los valores están representados en unidades/mg proteína/ml y son el promedio del experimento realizado por quintuplicado.

4.6- Efecto de *KlGpa1* en la expresión de *KlFus1*

En *S. cerevisiae* la respuesta a las feromonas de apareamiento está mediada por una proteína G heterotrímica. Esta proteína G está compuesta por las subunidades α (*ScGpa1*), β (*ScSte4*) y γ (*ScSte18*). De estas subunidades, el dímero $\beta\gamma$ es el encargado de modular positivamente a la vía de MAPKs activada en presencia de la feromona sexual de tipo sexual contrario (Whiteway *et al.*, 1995). En *K. lactis*, el elemento de la proteína G que mejor se ha caracterizado como parte de la vía de respuesta a feromonas es el gen *KlGpa1*, que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (Saviñón *et al.*, 2001). Los estudios realizados muestran varias diferencias importantes en el papel que llevan a cabo las subunidades alfa en la respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

La interrupción de *ScGpa1* en células haploides de *S. cerevisiae* tiene como consecuencia la interrupción del ciclo celular en la fase G_1 y la consecuente formación de "shmoos", producto de la activación constitutiva de la vía. Esta interrupción finalmente tiene un efecto letal sobre las células (Sprague y Thorner, 1992; Spain *et al.* 1995). La interrupción de *KlGpa1* en células haploides de *K. lactis* dan como resultado una cepa viable y no se presentan cambios aparentes en su morfología (Saviñón *et al.* 2001). Sin embargo, en estas mutantes se observó una reducción de 3 veces en el número de células gemantes, lo que sugiere un arresto en la fase G_1 del ciclo celular (Saviñón *et al.* 2001). Asimismo, la interrupción $\Delta KlGpa1$ en *K. lactis* disminuye aproximadamente 20 veces su capacidad de apareamiento respecto a la cepa silvestre, sin importar el tipo sexual del parental que la posea, y el mayor efecto se observa cuando ambos parentales llevan esta interrupción (Saviñón *et al.*, 2001). El hecho de que la interrupción de *Gpa1* en *K. lactis* cause una disminución en el proceso de apareamiento y no sea letal para las células, muestran que *KlGpa1*, a diferencia de *ScGpa1* en *S. cerevisiae*, es un elemento de transducción positivo del sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis* (Saviñón *et al.*, 2001).

Sabemos que el gen *KlFus1* se requiere para el proceso de apareamiento en células haploides de *K. lactis* y que su eliminación provoca una disminución en la formación de los diploides, mismo efecto que presenta la interrupción de *KlGpa1*. También sabemos que la transcripción de *KlFus1* se induce en respuesta a la feromona. Asimismo se encuentra reportado que *KlGpa1* está involucrado en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento (Saviñón *et al.*, 2001). Esto nos llevó a pensar que probablemente ambos elementos se encuentran en la misma vía. Para probar la relación que pudiera existir entre *KlFus1* y *KlGpa1* expresamos el alelo *KlGpa1*^(Q298L) del gen *KlGpa1* (fig. 3c) en células haploides de tipo silvestre de *K. lactis* de sexo α transfectadas con la fusión *KlFus1-LucZ* (fig. 4a). El alelo *KlGpa1*^{Q298L} lleva una transversión en el segundo nucleótido (A por T) del triplete que codifica para la glutamina 298, que da lugar a una leucina. Resultados obtenidos en el laboratorio muestran que este alelo es capaz de complementar la interrupción $\Delta KlGpa1$. También sabemos que la actividad de GTPasa en esta subunidad α mutada es menor a la de la silvestre, por lo que este alelo es capaz de mantener activa la vía de transducción sin necesidad de la presencia de la feromona.

Los datos obtenidos en este experimento están en la tabla 4 y figura 18. En dicha tabla podemos observar que en presencia de la feromona del tipo sexual contrario (α), la actividad transcripcional de *KIFus1* en células que expresan *KIGpa1*^{Q298L} fue 1.5 veces mayor que la actividad de las células que sólo expresan la fusión *KIFus1-LacZ*, y 15 veces mayor que la de las células en condiciones basales. La diferencia entre la actividad obtenida en las células que expresan *KIGpa1*^{Q298L} y las que sólo expresan la fusión *KIFus1-LacZ* nos indica que la transcripción de *KIFus1* es consecuencia directa de la vía activada por la *KIGpa1*. Basta que la vía esté encendida por la actividad de *KIGpa1* para que se presente la activación de *KIFus1*, sin necesidad de que la feromona del sexo contrario esté presente.

| Construcción | Sin feromona | Feromona α | Feromona α | |
|--------------------|--------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | | | <i>Klga1</i> ^{Q298XL} | <i>KISte12</i> |
| <i>KlFus1-LacZ</i> | 251 \pm 28 | 2694.9 \pm 137.8 | 3944.7 \pm 1165.3 | 4547.8 \pm 1354.752 |
| <i>LacZ</i> | 32 \pm 9 | 33 \pm 8 | 36 \pm 12 | 26 \pm 7 |
| Vector | 54 \pm 17 | 34 \pm 15 | 43 \pm 10 | 16 \pm 8 |

Tabla 4. Actividad transcripcional del promotor del gen *KlFus1* en células haploides de *K. lactis* de tipo silvestre. La inducción se hizo por 6 horas en presencia de la feromona del sexo contrario. Los valores están representados en unidades/mg proteína/ml y son el promedio del experimento realizado por quintuplicado. Aquí se presentan con su respectiva desviación estandar. Los valores de los controles obtenidos en los experimentos en presencia de la feromona del mismo sexo son prácticamente iguales a los aquí representados.

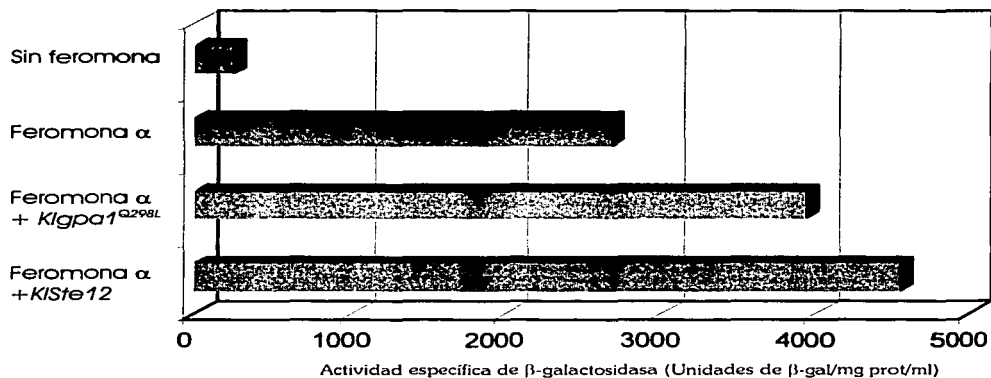


Figura 18. Activación transcripcional del gen *KlFus1* en respuesta a distintos elementos de la respuesta a feromonas en *K. lactis*. Los datos aquí representados corresponden a los obtenidos de las células de haploides de *K. lactis* de sexo α que llevan la fusión *KlFus1-LacZ* (ver tabla 4). Las condiciones se encuentran especificadas al lado de cada una de las barras, que en todos los casos representan el promedio de las unidades de β -galactosidasa/mg proteína/ml obtenidas de un quintuplicado para cada experimento.

4.7- Papel de *K/Ste12* en la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis*

Al definir al *KIFus1* como un gen cuya transcripción aumenta en respuesta a las feromonas de apareamiento, quisimos encontrar el elemento responsable de activar su transcripción. Siguiendo el esquema comparativo entre los elementos que conforman la vía de respuesta a feromonas sexuales en *S. cerevisiae* y los probables elementos que conforman la vía en *K. lactis*, elegimos como candidato a la proteína Ste12.

La proteína Ste12 (*ScSte12*) en *S. cerevisiae* es la encargada de transcribir los genes sexo específicos, así como también los genes involucrados en la conjugación sexual de las células, incluido el *ScFus1* (Dolan *et al.* 1989). Se ha observado que la actividad transcripcional de *ScFus1* en células haploides de *S. cerevisiae* inducidas con feromona (50 veces) desaparece cuando se interrumpe *ScSte12* (Dolan *et al.*, 1989; Dolan y Fields, 1990). Se sabe también que *ScSte12* requiere fosforilarse para llevar a cabo su función (Dolan y Fields, 1990). En *S. cerevisiae*, la fosforilación de este factor transcripcional es resultado de la activación de la vía de MAPKs que integran la respuesta a las feromonas (Crosby *et al.*, 2000).

Gracias a la complementación de una mutante $\Delta Scste12$ de *S. cerevisiae* se pudo clonar el gen homólogo *Ste12* de *K. lactis* (*K/Ste12*) (Yuan *et al.*, 1993). La homología entre el *K/Ste12* y *ScSte12* se estableció no sólo mediante la complementación de la mutante $\Delta Scste12$ de *S. cerevisiae*, sino también por medio de experimentos que compararon la capacidad de mediar la transcripción de genes sexo-específicos en *S. cerevisiae*, lo que dio como resultado que *K/Ste12* pudiera transcribirlos. Otros dos hechos reportados que contribuyeron de manera importante para definir a *K/Ste12* como un factor transcripcional es el hecho de que el dominio de unión a DNA de *K/Ste12* presenta homología con los dominios de unión a DNA de factores transcripcionales tipo Ste12 reportado para varias especies (Yue *et al.*, 1999) (fig. 19). Por último, mediante ensayos de protección a la DNasa, se observó que este dominio en *K/Ste12* reconoce la misma secuencia PRE que *ScSte12* (Yuan *et al.* 1993). Sin embargo, en el trabajo no se reportó el papel que tiene la proteína *K/Ste12* en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*, por lo que comenzamos por caracterizar al *K/Ste12* y, de poder definirlo como parte del sistema, nos veremos en la posibilidad de establecer su relación con los otros elementos reportados para la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*. Para ello, obtuvimos por PCR un fragmento que comprende la secuencia promotora (300 pb) y el marco de lectura abierto (2200 pb) del *K/Ste12* (fig. 3d). Utilizamos un par de cebadores de 18 nucleótidos, diseñados a partir de las posiciones -387 y +2230 de la secuencia reportada en el banco de datos (número de acceso: L21156). Utilizando un fragmento de 1200 pb, que comprende 300 pb de la secuencia 3' no codificante y 900 pb del ORF de *K/Ste12* (fig. 5c), generamos mutantes $\Delta K/ste12$ de ambos sexos por recombinación homóloga. Con ellas trabajamos primero sobre el efecto que tiene la interrupción de *K/Ste12* en el proceso de apareamiento en *K. lactis* (fig. 20).

En ausencia de *KlSte12*, se observó una disminución drástica en la formación de los diploides respecto a los obtenidos en la cruz entre las cepas silvestres, por lo que decimos que la cepa presenta un fenotipo estéril. Este fenotipo se observó independientemente del tipo sexual de la célula haploide que llevara la interrupción del $\Delta Klste12$ y sólo se requería uno de los parentales con la interrupción para obtener este resultado. El efecto observado cuando sobreexpresamos el *KlSte12* en una cepa silvestre es claramente un aumento en el número de diploides respecto a los obtenidos en la cruz de la cepa silvestre. En las observaciones para estas mismas cruces en *S. cerevisiae*, se ha reportado que la mutante $\Delta Scste12$ presenta un fenotipo estéril (Dolan *et al.* 1989), mismo fenotipo que presenta la cepa $\Delta Klste12$, mientras que, cuando se sobre-expresa el *ScSte12* en *S. cerevisiae* existe un aumento en la formación de los diploides (Dolan y Fields, 1990). Este mismo efecto lo observamos cuando sobreexpresamos el *KlSte12* en células haploides de tipo silvestre de *K. lactis*. En *S. cerevisiae* se relacionó la causa del aumento en la formación de diploides con la dosis génica de *ScSte12* utilizando células de tipo silvestre de *S. cerevisiae* que co-expresan el *ScSte12* bajo el control de su propio promotor en un plásmido de alto número de copias y una fusión *ScFus1-LacZ* (Dolan y Fields, 1990). En estos experimentos se observó que la transcripción del *ScFus1* se hacía constitutiva cuando *ScSte12* se sobreexpresaba y que los niveles de *ScSte12* eran letales para las células cuando la transcripción de *ScSte12* estaba bajo el control del promotor de galactosa y este se encontraba activo (Dolan y Fields, 1990).

Para saber si la dosis génica de *KlSte12* es responsable del aumento en la capacidad de apareamiento en *K. lactis* comparamos los niveles del mensajero de *KlSte12* en las siguientes células transfectantes de *K. lactis*: silvestre, $\Delta Klste12$ y silvestre que sobreexpresa el *KlSte12*. En la figura 21 podemos observar que los niveles de ARN mensajero en la cepa silvestre de *K. lactis* que sobreexpresa el *KlSte12* son mayores que los de la cepa silvestre. En la cepa $\Delta Klste12$ no observamos señal del mensajero. Al relacionar los niveles de ARN de *KlSte12* con la cantidad de diploides obtenida en cada cruz podemos pensar que *KlSte12* se requiere para el apareamiento celular y que su efecto sobre la vía de respuesta a las feromonas responsable de la formación del diploide en *K. lactis* es dosis-dependiente. Sin embargo, el hecho de tener una mayor cantidad de mensajero en la cepa silvestre que sobreexpresa el *KlSte12* no es suficiente para indicarnos el efecto que tiene sobre la posible activación de los genes requeridos por *K. lactis* para llevar a cabo el apareamiento y la consecuente formación de diploides. Por ello, quisimos probar el efecto de la sobreexpresión de *KlSte12* sobre la transcripción de *KlFus1* utilizando la fusión *KlFus1-LacZ*. Comparando la actividad transcripcional de *KlFus1* en células de sexo α de *K. lactis* contra la actividad que presenta en las células que sobreexpresan *KlSte12*, ambas incubadas con feromona de tipo α (tabla 4 y fig. 18), observamos que en las células que sobreexpresan el *KlSte12*, *KlFus1* presenta una actividad 1.7 veces mayor a la de las células que no lo sobreexpresan. Esta actividad es 20 veces mayor que la de las células que sólo llevan la fusión *KlFus1-LacZ* en ausencia de la feromona del sexo contrario. La diferencia entre la actividad de *KlFus1* cuando *KlSte12* se sobreexpresa y la actividad de *KlFus1* causada únicamente por la presencia de la feromona del sexo contrario nos indica que la sobreexpresión de *KlSte12* tiene un efecto dependiente de la dosis sobre la transcripción de *KlFus1* y esto pudiera causar la activación constitutiva de los genes que se transcriben en

respuesta a feromonas de apareamiento, tal como sucede en *S. cerevisiae* (Dolan y Fields, 1990).

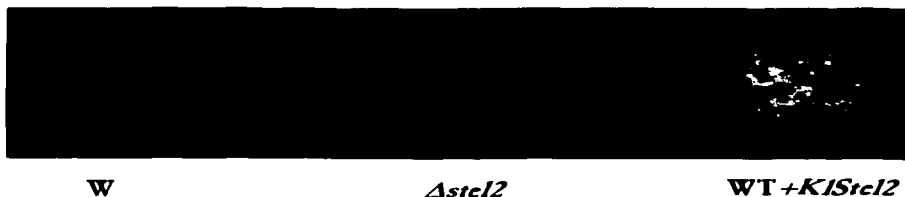


Figura 20. Formación de diploides a partir de las cruzas *WT*, $\Delta ste12$ y *Ste12* sobrexpresado de *K. lactis* contra una cepa silvestre de sexo contrario. Los apareamientos se hicieron durante 6 horas a 30 °C. Los diploides fueron seleccionados en medio SD sin aminoácidos y fotografiados después de 24 horas de incubación a 30°C



Figura 21. Transferencia tipo "Northern" de RNA total de *K. lactis*, utilizando como sonda el gen *K1Ste12*. La inducción de las cepas fue hecha 4 y 6 hrs, mismo tiempo que se dejaron las cruzas del experimento representado en la figura 18, en medio mínimo para asegurar el mantenimiento del vector en la célula y medio de cultivo saturado de una cepa del sexo contrario en una relación 1/4 v/v. Los números en la parte superior de cada carril indican la cepa de la cuál se obtuvo el ARN total. La extracción de ARN se hizo también a las 0 y 2 horas de inducción, sin que se mostrara variación en la señal obtenida en la cepa $\Delta K1ste12$. A las 0 horas de inducción solo se observa señal en el carril correspondiente al ARN obtenido de la cepa silvestre de *K. lactis* que sobrexpresas el *K1Ste12*. En cada carril se cargaron 30mg de ARN total.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para determinar si la actividad transcripcional de *KIFus1* requiere de la presencia de *KISte12* decidimos utilizar la fusión *KIFus1-Gfp* (fig. 4b y 4c) en la mutante $\Delta KISte12$. Mediante el uso de cualquiera de estas construcciones fuimos capaces de determinar que *KIFus1* se localiza en la periferia de las células silvestres cuando la vía de transducción es activada por la presencia del elemento de control positivo de la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*, *KIGpa1* (ver punto 4.9). Debido a la falta de marcadores en las cepas de *K. lactis lac4* utilizadas en este trabajo, no fue posible el uso de la fusión *KIFus1-LacZ*.

En las células haploides de tipo silvestre de *K. lactis* que co-expresan el *KISte12* y la fusión *KIFus1-Gfp* observamos que la proteína *KIFus1* se presenta en la periferia de las células, sin que sea necesario incubarla con feromona (Fig 22a), mientras que en una cepa haploide $\Delta KISte12$ que expresa la fusión *KIFus1-Gfp* no pudimos detectar fluorescencia (fig. 22b). La fluorescencia se presenta solamente cuando la cepa $\Delta KISte12$, transfectada con la fusión *KIFus1-Gfp*, expresa el *KISte12* (fig. 22c). Estos resultados no sólo nos sugieren que *KISte12* es necesario para la transcripción de *KIFus1*, sino que también corroboran el efecto de activación constitutiva que presenta el *KIFus1* causada por la sobreexpresión de *KISte12*.

Agrupando estos resultados, podemos plantear que el factor transcripcional *KISte12* se requiere tanto para el apareamiento en *K. lactis* como para activar la transcripción de *KIFus1* en respuesta a las feromonas sexuales. También, que la sobreexpresión de *KISte12* es suficiente para eliminar el requerimiento de la activación de la cascada de señales por parte de la feromona del sexo contrario. Este efecto también lo vemos cuando expresamos la versión activa de *KIGpa1*.



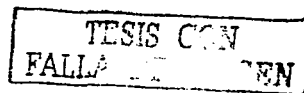
Figura 22. Transcripción de *KIFus1* en células haploides de *K. lactis* dependiente del factor transcripcional *KISte12*. Todas las cepas fueron transfectadas con la fusión *KIFus-Gfp*. a) *WT+KISte12* b) $\Delta KISte12$ c) $\Delta KISte12+KISte12$.

4.8- Relación entre *KlSte12* y el elemento de control positivo de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*: *KlGpa1*.

Hemos probado que la transcripción de *KlFus1* es activada por *KlGpa1* y por la sobreexpresión de *KlSte12*, por lo que suponemos que *KlGpa1*, *KlSte12* y *KlFus1* forman parte de la misma vía. Sin embargo, el efecto de la interrupción de *KlSte12* y *KlGpa1* en el apareamiento es el mismo. Ambas tienen como resultado una disminución en la formación de diploides durante las cruces entre células haploides de sexo opuesto en *K. lactis*. Esto nos llevó a pensar que probablemente ambos elementos se encuentran en la misma vía. Para probar este punto expresamos el alelo *KlGpa1*^{Q298L} del gen *KlGpa1* en una cepa haploide $\Delta KlSte12$ y vimos el efecto de esta expresión en el apareamiento.

Se hicieron las siguientes cruces de la cepa $\Delta KlSte12$: $\Delta KlSte12 + KlGpa1$ ^{Q298L} $\times KlSte12$; $\Delta KlSte12 \times KlSte12$ y $\Delta KlSte12 + KlSte12 \times KlSte12$. Los resultados se muestran en la figura 23. En ellos observamos que la cepa $\Delta KlSte12$ que expresa *KlGpa1*^{Q298L} presentó el mismo fenotipo estéril que la cepa $\Delta KlSte12$, por lo que *KlGpa1* no es capaz de complementar la mutación $\Delta KlSte12$, posiblemente debido a que no se transcriben los genes necesarios para la conjugación sexual. Pensamos que *KlSte12* es el factor transcripcional encargado de realizar esta función mientras que *KlGpa1* se encarga de activar la vía de respuesta a feromonas de apareamiento de forma análoga al dímero $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica en *S. cerevisiae*. Al comparar la posición de estos elementos en la cascada de señales en *S. cerevisiae* podemos ver que *ScGpa1* se encuentra corriente arriba de *ScSte12* (fig. 2). Utilizando la fusión *KlFus1-Gfp* en una cepa haploide $\Delta KlSte12$ de *K. lactis* que expresa *KlGpa1*^{Q298L} (fig. 24a) podemos confirmar que *KlFus1* no se activa, puesto que no se presentó la localización de la fluorescencia que observamos cuando una cepa haploide de *K. lactis* de tipo silvestre co-expresaba la fusión *KlFus1-Gfp* y *KlGpa1*^{Q298L} (fig. 24b). La fluorescencia localizada se volvió a presentar cuando en la cepa $\Delta KlSte12$ co-expresamos el alelo *KlGpa1*^{Q298L} con el gen *KlSte12* (fig. 24c). En estos experimentos no pudimos percibir la presencia de células con las proyecciones en la cepa $\Delta KlSte12$ de *K. lactis* que expresa *KlGpa1*^{Q298L} que normalmente observamos en una pequeña proporción en la cepa de tipo silvestre que expresa este alelo. Por eso pensamos que *KlSte12* se requiere para la formación de las mismas, posiblemente activando algunos genes involucrados en este proceso.

El hecho de que *KlGpa1* sea incapaz de complementar la falta de *KlSte12*, que *KlFus1* no se transcriba y que no se formen las proyecciones celulares en ausencia de *KlSte12* aún cuando la vía esté activada por *KlGpa1*, nos sugiere que ambos elementos forman parte del mismo sistema, y nos llevan a suponer que probablemente *KlGpa1* esté ubicado corriente arriba de *KlSte12* en la cascada de señales en *K. lactis* de la misma manera que en *S. cerevisiae*.





$\Delta Kiste12+$
 $Klga1^{Q298L}$

$\Delta Kiste12$

$\Delta Kiste12+$
 $KISte12$

Figura 23. Cruzas de la cepa $\Delta ste12$ de *K. lactis*. Los apareamientos se hicieron 6 horas a 30 °C. Los diploides fueron seleccionados en medio mínimo (SD) y fotografiados después de 24 horas de incubación a 30°C.

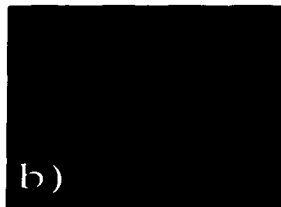
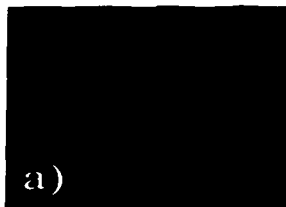


Figura 24. Transcripción de *KIFus1* en células haploides de *K. lactis* dependiente de *KISte12* y *KlGpa1*. Todas las cepas utilizadas fueron transfectadas con la fusión *KIFus1-Gfp*. a) $\Delta Kiste12+Klga1^{Q264L}$ b) $WT+ Klga1^{Q264L}$ c) $\Delta Kiste12+KISte12+ Klga1^{Q264L}$. Las células fueron fotografiadas después de 24 horas de crecimiento a 30°C. Únicamente se muestra la fluorescencia en las células no diferenciadas.

4.9 – Localización subcelular de *KFus1* en *K. lactis*.

Una característica que adquieren las células haploides de *S. cerevisiae* en la respuesta a las feromonas de apareamiento es el cambio en su morfología, de forma ovalada (fig. 25a) a una forma de pera conocida como “Shmoo” (fig. 25b). El estado shmoo puede observarse en las células haploides tratadas con feromona de tipo sexual contrario, o por células que expresan un alelo de *ScGpa1* con una deficiencia en su actividad intrínseca de GTPasa en ausencia del estímulo (Kurjan *et al.* 1991). En esta etapa temprana de la formación de los diploides los gametos re-orientan su polaridad, aparentemente en respuesta al gradiente de feromona producida por la célula del otro sexo más cercana (Marsh, 1991; Segal, 1993; Amberg *et al.*, 1995; Dorer *et al.*, 1995; Moskow *et al.*, 2000; Poritz *et al.*, 2001). Esto da como resultado que la célula dirija su crecimiento hacia la célula del sexo contrario mediante la formación de una proyección (Kurjan, 1990; Roberts y Fink, 1994) a partir del mismo sitio de donde la célula haploide gema durante su estado vegetativo (Thorner, 1980). Este sitio se encuentra marcado por un anillo de quitina fácil de distinguir, pues presenta las cicatrices de las gemas producidas por la levadura (Drubin, 1991). También las proyecciones pueden formarse a partir de sitios distintos al polo de gemación, lo que sugiere una cierta interacción de las células que se encuentran muy cercanas una de la otra (Madden y Snyder, 1998).

La formación de la proyección causada por la activación de la vía de transducción en respuesta a las feromonas sexuales en *S. cerevisiae*, requiere de un remodelamiento del citoesqueleto, de tal manera que la célula crezca de forma asimétrica y que, por otra parte, se inhiba el proceso de gemación (Barnes *et al.*, 1990). Durante la formación de la proyección comienzan a acumularse parches de actina filamentosa (F-actina), en forma de agregados, en la corteza celular subyacente al sitio de crecimiento, mientras que se forman cables de actina alineados con respecto al eje más largo de la proyección (Hasek *et al.*, 1987; Gehrung y Snyder, 1990; Snyder *et al.*, 1991). Los microtúbulos se extienden del huso acromático de la membrana nuclear hasta la punta de la proyección (Hasek *et al.*, 1997; Meluh y Rose, 1990). El núcleo tiende a colocarse en la parte media del cuello de la proyección y se orienta colocando su huso acromático frente a la punta de la proyección (Baba *et al.*, 1989; Sprague y Thorner, 1992). Es en este punto donde se localiza la proteína *ScFus1* y por donde se lleva a cabo primero la fusión membranar y posteriormente la fusión nuclear de los gametos para formar el diploide (Trueheart *et al.*, 1987).

En cultivos de cepas haploides de tipo sexual α de *K. lactis* (fig. 25c), tratadas con feromona del sexo contrario, se han podido distinguir células que presentan alargamientos en su morfología (fig. 25d) y que tienen cierta semejanza con la forma característica (shmoo) que toman los gametos de *S. cerevisiae* cuando las células haploides se exponen a la feromona (fig. 25b). El aumento de la frecuencia de aparición de estas formas en *K. lactis* la hemos observado también en células de tipo silvestre que expresan *Klgpa1*^{Q298L} y en mutantes Δ *gpa1* que expresan *Klgpa1*^{Q298L}, por lo que creemos que esta forma resulta de la activación constitutiva de la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis* por parte de la *Klgpa1*^{Q298L}. Pensamos que esto pudiera constituir una forma de diferenciación que toman las células previa al evento de conjugación sexual en *K. lactis*, y que posiblemente este proceso pudiera requerir del remodelamiento del citoesqueleto para



S. cerevisiae



K. lactis

Sin feromona

Con feromona

Figura 25. Estados morfológicos de células haploides de *S. cerevisiae* (a y b) y *K. lactis* (c y d). Del lado derecho se indica la especie de levadura. Abajo se indica el tratamiento para cada uno de los cultivos celulares. La inducción en cada caso (b y d) se hizo utilizando la feromona de la cepa del sexo contrario para cada especie (ver material y métodos). Las microfotografías se tomaron a las 6 horas de inducción para el caso b y d, mientras que para el caso a y c se dejaron crecer en ausencia de la feromona del sexo contrario por el mismo periodo de tiempo. En las figuras a y c se observan claramente un número de células en proceso de gemación, mientras que en las figuras b y d el número de células gemantes es menor.

que se lleve a cabo la fusión membranal y nuclear. Con la finalidad de determinar la localización subcelular de *KIFus1* y probar si existe alguna relación entre su ubicación y el estado de diferenciación morfológica que presentan las células cuando la vía de transducción en respuesta a feromonas se encuentra activada, tal y como sucede con *ScFus1* en *S. cerevisiae*, fusionamos la secuencia de *KIFus1* con la secuencia de la proteína verde fluorescente (*Gfp*) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999). La primera construcción contiene el fragmento de 1138 pb de *KIFus1* utilizado para la construcción *KIFus1-LacZ*, que lleva 264 pb del marco de lectura abierto, que codifican para 88 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal de *KIFus1* y 874 pb de la región 3' no codificante con la secuencia *Gfp* (750 pb) (fig. 4b). Esto lo hicimos ya que probamos que el tamaño de la secuencia promotora era suficiente como para que la transcripción se active en respuesta a la feromona del sexo contrario y en presencia del alelo *Klgpal*^{Q264L}. Al no estar seguros de que la secuencia codificante contenida en esta fusión fuera suficiente para garantizar la correcta localización de *KIFus1*, hicimos otra construcción que lleva un fragmento de 2838 pb, el cual contiene 1505 pb de la región 3' no codificante y la totalidad del ORF de *K. lactis* (1533 pb) fusionado con la secuencia *Gfp* (fig. 4c). El fragmento de 2838 pb se obtuvo por PCR utilizando como cebadores un par de deoxiligonucleótidos de 20 nucleótidos, diseñados a partir de las posiciones -1324 y +1435 de la secuencia *KIFus1*. Con ambas construcciones transfectamos células haploides de *K. lactis*, de tipo silvestre, que expresan *Klgpal*^{Q298L}. En las observaciones que a continuación se presentan no existe diferencia entre los resultados obtenidos, cualquiera que fuera la construcción *KIFus1-Gfp* que expresen.

En la figura 26 observamos que *KIFus1p* se localiza, en gran medida, en la punta (fig. 26a) y el cuello (fig. 26b) de la proyección de las células diferenciadas, mientras que en células que no presentan esta proyección se presenta exclusivamente en la periferia de la célula (fig. 26b). El hecho de que con ambas construcciones se observe la misma localización nos indica que los primeros 88 aminoácidos de la proteína *KIFus1* son suficientes para que la proteína se ubique. La localización de la fluorescencia en la periferia de las células que no presentan las proyecciones, junto con la presencia de sitios potenciales de glicosilación en el extremo amino de la proteína y el cruce transmembranal apoya la idea de que muy probablemente *KIFus1* sea una proteína de membrana. Respecto a la distribución de la fluorescencia en las células que forman la proyección y las que no, nos sugiere que la distribución de *KIFus1* es diferencial y su localización depende de la morfología.

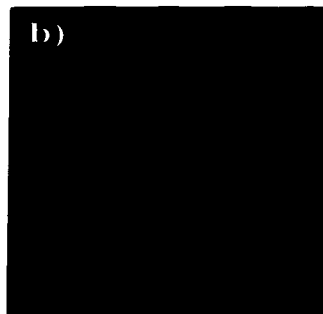
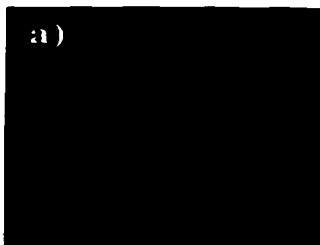


Figura 26. Localización subcelular de *KIFus1* en *K. lactis*. Las fotografías muestran un corte hecho a células diferenciadas tipo α transfectadas con el alelo *K1gpa1*^{G298L} que expresan la fusión *KIFus1-Gfp*. a) Localización de la fluorescencia en la punta de la proyección de la célula. b) Localización de la fluorescencia en el cuello de la proyección (parte superior de la imagen) y en la periferia de las células no diferenciadas (parte inferior derecha de la imagen).

-Una vez que el hombre ha conquistado el miedo, está libre de él por el resto de su vida, porque a cambio del miedo ha adquirido la claridad: una claridad de mente que borra el miedo. Para entonces, un hombre conoce sus deseos; sabe como satisfacer esos deseos. Puede prever los siguientes pasos del aprendizaje, y una claridad nítida lo rodea todo. El hombre siente que nada está oculto.

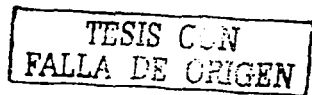
" Y así ha encontrado a su segundo enemigo: ¡la claridad! Esa claridad de mente, tan difícil de obtener, dispersa el miedo, pero también ciega "

"Fuerza al hombre a no dudar nunca de sí. Le da la seguridad de que puede hacer todo lo que se le antoje, porque todo lo que ve lo ve con claridad. Y tiene valor porque tiene claridad, y no se detiene ante nada porque tiene claridad. Pero todo eso es un error; es como si viera algo claro pero incompleto. Si el hombre se rinde a esa ilusión de poder, ha sucumbido a su segundo enemigo y será torpe para aprender. Se apurará cuando debía ser paciente, o será paciente cuando debería apurarse. Y tonteará con el aprendizaje, hasta que termine incapaz de aprender nada más."

" Un hombre derrotado en esta forma no muere, solo ha sido parado en seco en sus intentos por hacerse hombre de conocimiento; en vez de eso, el hombre puede volverse un guerrero impetuoso o un payaso. Pero la claridad que tan caro ha pagado no volverá a transformarse en oscuridad y miedo. Será claro mientras viva, pero ya no aprenderá ni ansiará nada."

"Para evitar la derrota debe de hacer lo mismo que hizo con el miedo: debe desafiar su claridad y utilizarla sólo para ver, y esperar con paciencia y medir con tiento antes de dar otros pasos; debe pensar, sobre todo, que su claridad es casi un error. Y vendrá un momento en que comprenda que su claridad era solo un punto delante de sus ojos. Y así habrá vencido a su segundo enemigo, y llegará a una posición donde ya nadie puede dañarlo....."

"Las Enseñanzas de Don Juan"
Carlos Castaneda.



5. Discusión

La respuesta a las feromonas sexuales en *S. cerevisiae* es un proceso que inicia cuando las células haploides reciben el estímulo hormonal por parte de la célula del sexo contrario, concluyendo en la transcripción de una serie de genes cuya función orquestada es causa de la conjugación sexual de los gametos (van Drogen *et al.* 2001; Konopka y Fields. 1992).

Cuando la feromona del sexo contrario se une al receptor membranal específico de la célula haploide, la interacción física de este receptor con la proteína G heterotrimérica que lleva acoplado se ve afectada (Oehlen y Cross, 1994; Breikreutz *et al.*, 2001). Dicha alteración resulta en la disociación de la proteína G, cuyo dímero $\beta\gamma$ se encarga de transducir la señal a una serie de cinasas, lo que al final deriva en la transcripción de una serie de genes cuyos productos tienen efectos tales como el arresto en la fase G₁ del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto, la fusión membranal y por último la fusión nuclear para la formación de los diploides (Oehlen y Cross, 1994; Breikreutz *et al.*, 2001).

Fus1 es uno de los genes cuya transcripción se activa en la respuesta a las feromonas sexuales en *S. cerevisiae* (Trueheart *et al.* 1987). *ScFus1* participa en la fusión membranal de los gametos durante la formación del diploide (Trueheart y Fink, 1989). Los estudios sobre este gen han permitido analizar el efecto producido por cualquier alteración en el sistema, así como también para establecer modelos alternativos para estudiar el evento de la fusión membranal en organismos superiores (White, 1992; Sprague y Thorner, 1992; Herskowitz, 1988; Rose, 1996; Marsh y Rose, 1997; Brizzio *et al.*, 1998).

En el laboratorio estamos interesados en definir la cascada de señales activada por las feromonas de apareamiento en la levadura *K. lactis* y conocer sus componentes. En este trabajo se describe un nuevo componente del sistema, el *KIFus1*, y su relación con otros dos elementos que integran la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*; *KIStel2* y *KIGpal*.

Utilizando la información disponible a partir de la secuenciación del genoma de *K. lactis* sobre un fragmento reportado como *KIFus1* (Bolotin-Fukuhara *et al.* 2000), fuimos capaces de clonar un fragmento que contiene el marco de lectura abierto en su totalidad y 1305 pb de secuencia 5' no codificante, donde pensamos se encuentra la región promotora.

La traducción del marco de lectura muestra una proteína que, comparada en su totalidad con las secuencias primarias reportadas en el banco de datos, resulta tener el mayor porcentaje de identidad con *ScFus1*. Aunque la similitud entre ambas secuencias primarias es baja, se trata de proteínas homólogas. Teóricamente, *KIFus1* presenta un extremo amino terminal con varios sitios potenciales de glicosilación orientado hacia el exterior celular, seguido de un cruce transmembranal y un extremo carboxilo con un dominio SH3 orientado hacia el citoplasma. Esta misma estructura la encontramos reportada para *ScFus1* (Trueheart y Fink, 1989), una proteína de membrana de un solo cruce transmembranal, que tiene orientado su extremo amino hacia el periplasma celular, mismo que se encuentra glicosilado en los residuos de serinas y treoninas por oligosacáridos de cadena corta, de entre 5 y 10 residuos de manosa. Esta glicosilación se ha reportado en las levaduras únicamente en los dominios externos de las proteínas de

membrana y de vacuola (Lehle *et al.*, 1977; Marriott *et al.*, 1979; Trueheart y Fink, 1989; Schmitt y Pfeiffer, 1990; Heimo *et al.*, 1997; Van Hoof *et al.*, 1991; Bourdineaud *et al.*, 1998; Chen, *et al.*, 1999). El hecho de que la secuencia primaria del extremo amino de *KIFus1* tenga residuos de serinas y treoninas con un alto potencial como blanco de glicosilación, seguido de un cruce transmembranal hipotético, así como la alta probabilidad de que el extremo amino se encuentre orientado hacia el exterior celular nos hace pensar que muy probablemente esta proteína se localice en la membrana plásmática. Esta propuesta se apoya también en la observación de la distribución de la fluorescencia en la periferia de las células transfectadas con la fusión *KIFus1-Gfp* que tienen encendida constitutivamente la cascada de señales en respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*, efecto causado por la actividad del alelo *Klgpa1*^{Q298L}. Esta distribución se observa en estas células cuando expresan no sólo la fusión *KIFus1-Gfp* que lleva el marco de lectura abierto de *KIFus1* en su totalidad, sino que también la observamos cuando solamente lleva la secuencia que codifica para los primeros 88 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal de *KIFus1*, lo que nos permite proponer también que esta secuencia pudiera cumplir la función de péptido señal, ya que su presencia es suficiente como para que la proteína *KIFus1* se localice. En *S. cerevisiae* no se ha determinado la existencia de péptido señal y por lo tanto tampoco la longitud mínima del extremo amino terminal para definirlo. Sin embargo, se ha reportado que este extremo es importante para su ubicación subcelular, ya que células haploides de *S. cerevisiae* que expresan una versión truncada de la proteína *ScFus1* en el extremo amino no presentan la localización en la membrana (McCaffrey *et al.* 1987).

En el extremo carboxilo de ambas proteínas hay un dominio de tipo SH3 (homólogo a Src de tipo 3). Comenzaremos primero por definirlo. El dominio SH3 se encontró en la región moduladora de una oncoproteína de tipo tirosín-cinasa citoplásmica, llamada Src (Mayer *et al.*, 1988). Desde entonces se le ha encontrado en una gran variedad de proteínas involucradas en transducción de señales, tanto citoplásmicas como asociadas a la membrana (Mussacchio *et al.*, 1992; Pawson, 1994; Pawson, 1995). En general, el dominio SH3 abarca 60 residuos de aminoácidos, de los cuales solo 10 interactúan directamente con su ligando, uniéndose específicamente a secuencias ricas en prolina, específicamente al motivo PxxP, presente en las proteínas como la actina (Ren *et al.*, 1993). Posteriormente se propuso que estos dominios SH3 servían como intermediarios entre elementos que integran una cascada determinada de señales, ya sea corriente arriba o corriente abajo (Mayer, 2001). Esta capacidad del dominio SH3 para interactuar físicamente con proteínas relacionadas con el citoesqueleto, así como de regular procesos de transducción de señales explica la gran variedad de procesos celulares en los que se encuentra involucrado, tales como la regulación de enzimas por medio de interacciones moleculares, incrementando o alterando la concentración subcelular de elementos involucrados en cascadas de señalización o mediando el ensamblaje de complejos multiproteicos (Mayer, 2001). Uno de los ejemplos clásicos de la importancia en la función de intermediario en las cascadas de señalización y promotor del ensamblaje de complejos multiproteicos del dominio SH3, es el papel que tiene en el síndrome del querubismo, una enfermedad hereditaria autosomal dominante en humanos, que se caracteriza por la rápida degradación de las mandíbulas superior e inferior, con el desarrollo posterior de grandes masas de tejido fibroso. Esta enfermedad es causada por mutaciones que han sido mapeadas en el dominio SH3 de la proteína SH3BP2 localizada en el cromosoma 4p16.3 del humano (Ueki *et al.*, 2001). Esta

proteína es parte de la vía de señalización de la cinasa citoplásmica c-Abl, que participa en la reparación del ADN dañado por algunos factores, principalmente por radiación ionizante. Alteraciones en esta proteína forman parte importante del proceso de la oncogénesis (Cong *et al.*, 2002).

Un ejemplo de la importancia de las funciones del dominio SH3 durante la respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* es el proporcionado por la proteína Bem1, la cual tiene una función que abarca los tres principales eventos causados por la activación de la cascada de señales, a saber: la transcripción de una serie de genes (i.e *Fus1*), el arresto celular en la fase G₁ del ciclo y el crecimiento polarizado de la célula (formación de “shmoo”) (Peterson *et al.*, 1994).

El punto de convergencia entre la vía de las MAPKs de la respuesta a las feromonas (Ver figura 2) y los elementos responsables del crecimiento polarizado de la célula en *S. cerevisiae* está dado por la interacción de la proteína ScSte20 y las proteínas ScCdc24, ScCdc42 y ScBem1 (Oehlen y Cross, 1998). Estas tres últimas proteínas regulan el crecimiento polarizado durante la formación del “shmoo” y la gemación (Bender y Pringle, 1989). Cdc24 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GDP-GTP) dependiente de calcio (Miyamoto *et al.*, 1991), y su sustrato es la GTPasa tipo Rho Cdc42 (Nobes y Hall, 1994; Simon *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995). La inactivación de cualquiera de las dos proteínas en células haploides de *S. cerevisiae* da como resultado que, cuando se activa la vía de respuesta a las feromonas, los gametos no forman las proyecciones necesarias para el apareamiento, e impiden la inducción de los genes involucrados en la respuesta a feromonas (Simon *et al.*, 1995). Las células haploides de *S. cerevisiae* que expresan una versión termosensible de Cdc24 son incapaces de gemar (Sloat *et al.*, 1981), no forman la proyección en respuesta a las feromonas de apareamiento (Field y Schekman, 1980) y reducen drásticamente su capacidad de apareamiento (Reid y Hartwell, 1977). Bem1 es una proteína con un dominio SH3 que se une directamente a Cdc24. Ambas se localizan cerca de los parches corticales de actina que marcan el sitio de gemación y regulan el citoesqueleto. Cdc42 y su regulador, Cdc24 unido a Bem1, se encuentran en un complejo multiproteico que se encuentra en el sitio de gemación de las células haploides (Adams *et al.*, 1990; Lyons *et al.*, 1996). Cuando la proteína G se disocia en sus subunidades G α y G $\beta\gamma$ por la interacción del receptor con la feromona, el dímero $\beta\gamma$ activa a la vía de MAPKs por medio de su interacción con Ste20. Es en este momento cuando Cdc42, acoplado a Cdc24 unido a Bem1, interactúa con Ste20 y con la subunidad G β del dímero $\beta\gamma$. El complejo Ste20- $\beta\gamma$ -Cdc42-Cdc24(Bem1) interactúa entonces directamente con el módulo Ste5 que lleva unidos a las proteínas Ste11, Ste7 y Fus3, lo que da la especificidad para que el factor transcripcional Ste12 sea fosforilado por este complejo y por lo tanto active a los genes requeridos para que se lleve a cabo la conjugación sexual. La interacción del complejo Ste20- $\beta\gamma$ -Cdc42-Cdc24(Bem1) con Ste5(Ste7-Ste11-Fus3) está mediado por la proteína Bem1, específicamente por su dominio SH3, y no sólo influye en la transducción de la señal corriente abajo de Ste20, sino que también Bem1 es capaz de reclutar en este mismo complejo a la proteína Far1 (Butty *et al.* 1998), el cual es un controlador del ciclo celular. Gracias a esta interacción, Far1 es capaz de inhibir la actividad de los productos involucrados en la transición de la fase G₁-S del ciclo celular y

por lo tanto, permiten el arresto en la fase G₁ del ciclo (Valtz y Peter, 1997; Butty *et al.*, 1998).

En la selección del sitio por donde se va a llevar a cabo la formación de la proyección en presencia de gradientes de feromona, está también involucrada la proteína ScRsr1. Rsr1 es una proteína de unión de GTP de la superfamilia Ras que está involucrada en la selección del sitio de gemación (Dorer *et al.* 1995). Cuando se une con la proteína Cdc24, su actividad de GTPasa se inhibe y entonces funciona como intermediaria en la unión de Bem1 y Cdc24. Esta unión permite la ubicación del complejo Ste20-βγ-Cdc42-Cdc24(Bem1)-Far1-Rsr1 en la membrana plasmática, justo en el sitio de gemación. La ubicación de este complejo marca el punto por el cual se comenzará a reorganizar el citoesqueleto para iniciar el crecimiento polarizado de la célula, que le da la forma característica de "schmoo" (Zheng *et al.* 1995; Park *et al.* 1997).

En resumen, la proteína de tipo SH3, Bem1, que se requiere durante la reproducción vegetativa de las células haploides de *S. cerevisiae*, está involucrada con el proceso de transducción de señales en respuesta a feromonas de apareamiento en dos niveles: sirve como intermediario en la transducción de la señal y permite el ensamblaje de un complejo multiproteico de MAPKs localizándolas en un punto subcelular específico. Estas dos funciones dan como resultado el arresto celular en la fase G₁ del ciclo, y el establecimiento del sitio de la formación de la proyección, que define el sitio por donde se llevará a cabo la fusión membranal y nuclear.

Una vez formada la proyección en *S. cerevisiae*, entramos al terreno de la especulación sobre el papel del dominio SH3 presente en el extremo carboxilo terminal de ScFus1, mismo que se encuentra en el extremo carboxilo de KIFus1. Se cree que, en primer lugar, el dominio SH3 de ScFus1 interactúa con los filamentos de actina del citoesqueleto y se dirige hacia el punto donde se encuentra el complejo multiproteico que definió al sitio donde se comenzó a formar la proyección, mismo por donde se lleva a cabo la gemación (Dorer *et al.* 1995). Experimentos con células haploides de *S. cerevisiae* inducidas con feromona de tipo sexual contrario expuestas a Latrunculina-A, un fármaco que impide la formación de cables de actina (Ayscough, 1998), muestran que el ScFus1 no es capaz de ubicarse en la punta de la proyección (Finger y Novik, 1998). Asimismo, las células haploides de *S. cerevisiae* que expresan una versión de ScFus1 mutagenizada en el extremo carboxilo, específicamente en el dominio SH3, presentan defectos en su ubicación (Gammie *et al.*, 1998). El efecto de la mutagenización del dominio SH3 no sólo se limita a defectos en la ubicación subcelular de ScFus1; durante el proceso de fusión, una vez que ScFus1 está ubicada en el extremo de la proyección, comienzan a movilizarse una serie de vesículas que, se piensa, llevan las enzimas necesarias para degradar la pared celular justo en el punto de contacto entre las dos células que están por fusionarse (Barnes *et al.*, 1990; Sprague y Thorner, 1992; Park *et al.*, 1997). La ubicación de estas vesículas depende de la localización de ScFus1. Cuando el dominio SH3 de esta proteína presenta alteraciones, estas vesículas no pueden localizarse en el extremo de la proyección, dando como consecuencia la interrupción de la fusión membranal justo en el punto de contacto (Elion *et al.*, 1995). Un reporte relaciona a la proteína ScMyo5 con las proteínas con dominios SH3, con la estabilidad de las membranas, el transporte intracelular y la reorganización del citoesqueleto. Aunque no se ha establecido la función de esta proteína en el evento de la conjugación celular en *S. cerevisiae*, podría

estar relacionada, ya que los procesos en los que interviene se presentan y deben ser regulados durante la fusión membranal de los gametos. *ScMyo5* es una miosina de tipo I con un dominio de tipo SH3 que interactúa con la F-actina localizada en el sitio de gemación y por donde se forman las proyecciones en respuesta a la feromona. Las células haploides de *S. cerevisiae* que llevan una interrupción del gen presentan defectos en el crecimiento polarizado y la acumulación de membranas intracelulares. *ScMyo5* se localiza en el punto por donde se lleva a cabo el crecimiento polarizado, donde existe una acumulación de parches de F-actina, y cuando estas células expresan una versión de *ScMyo5* alterada en su dominio SH3 o son tratadas con Latrunculina-A presentan defectos en su localización, por lo que se sugirió que la interacción de la F-actina y *ScMyo5* está mediada por el dominio SH3. Mediante ensayos de doble híbrido y complementación genética, observaron que la interacción de *ScMyo5* con la F-actina está mediada por una proteína rica en secuencias de prolina, llamada *ScVrp1* y que esta interacción es importante para los procesos de crecimiento polarizado, la estabilidad de la membrana plasmática durante procesos como la endocitosis (Riezman *et al.* 1996) y el transporte intracelular (Anderson *et al.*, 1998). El hecho de que *KIFus1* presente un dominio SH3 en su extremo carboxilo terminal y que esta sea la zona donde se tiene la mayor homología entre *KIFus1* y *ScFus1* y si la función del dominio SH3 en la mediación en el establecimiento de complejos multiprotéicos está tan conservada (Mussacchio *et al.*, 1992), pudiera sugerir que este dominio sirva en *KIFus1* como punto de referencia para la ubicación de la maquinaria molecular que lleva a cabo el proceso de la fusión celular en algún punto específico, tal y como ocurre en *S. cerevisiae*.

ScFus1 está involucrada en la fusión de las membranas celulares requerida en el proceso de formación de los diploides (Trueheart *et al.* 1987). La intensidad del efecto causado por eliminación de *ScFus1* depende de la presencia de la interrupción en uno o ambos sexos. Cuando ambos parentales carecen de este gen el apareamiento de las células se interrumpe justo antes de la fusión citoplasmática (Trueheart y Fink. 1989). En cruza donde solo uno de los parentales lleva la interrupción $\Delta Scfus1$ la disminución en la formación de diploides es prácticamente nula. Esto se debe a que el *ScFus1* del otro parental es capaz de llevar a cabo el proceso de la fusión celular (McCaffrey *et al.* 1987; Trueheart *et al.* 1987). La complementación de la interrupción $\Delta ScFus1$ por parte de *KIFus1* nos permite proponer que *KIFus1* posiblemente participa en el proceso de la fusión membranal, ya que se tiene bien caracterizado el efecto de la interrupción $\Delta Scfus1$ en el apareamiento celular en *S. cerevisiae*. El hecho de que esta complementación sea de manera parcial, pudiera ser debida a la poca homología que existe entre las secuencias del extremo amino terminal, ya que en *S. cerevisiae* se piensa que el extremo amino terminal pudiera servir para el reconocimiento célula-célula por: su localización en el exterior celular y por el tipo de modificaciones post-traduccionales que presenta (glicosilaciones). También debido a que células que expresan una versión trunca en el extremo amino terminal de *ScFus1* presentan una interrupción en el proceso de fusión membranal en el punto de contacto, mismo defecto que presentan si no tuvieran el gen completo (Trueheart y Fink. 1989; Elion *et al.* 1995).

En la cruce donde ambos parentales llevan la interrupción de *ScFus1* en *S. cerevisiae* se presenta una disminución evidente en la formación de los diploides sin que esta llegue a

ser total. Esto se debe a la presencia de otro gen, el *ScFus2*. *ScFus2* participa en la fusión nuclear de las células haploides de tipo sexual contrario y se localiza cerca del sitio de fusión, y tiene un papel fundamental en el alineamiento de los núcleos durante la formación del cigoto (Elion *et al.* 1995). Aunque se determinó que la identidad entre las secuencias *Fus1* y *Fus2* de *S. cerevisiae* no son significativas de acuerdo al algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch. 1970; Elion *et al.* 1995), se ha demostrado que la sobreexpresión de *ScFus2* es capaz de revertir el efecto de la interrupción de *ScFus1* y viceversa (McCaffrey *et al.* 1987). Esto se debe a que ambas proteínas llevan a cabo su función en forma paralela y por lo tanto, una puede suplir la función de la otra (Elion *et al.* 1995).

La temperatura es un factor que afecta el proceso de fusión membranal de los parentales cuando ambos llevan la interrupción *ScFus1*, probablemente debido a que la falta de *ScFus1* durante el proceso de la fusión membranal permite que la temperatura afecte la integridad de las membranas (Elion *et al.* 1995). Esto permitió sugerir que una de las funciones de *ScFus1* sea mantener la integridad membranal, lo que permite una fusión controlada para establecer el puente citoplasmático entre ambos parentales y así permitir la formación del diploide (Elion *et al.* 1995).

En las cruza entre células haploides de tipo sexual contrario de *K. lactis* donde sólo uno de los parentales lleva la interrupción $\Delta Kifus1$ percibimos una reducción en la formación de los diploides, a diferencia de lo reportado para esta misma cruza en *S. cerevisiae*. Esta reducción en la formación de los diploides se hace más evidente cuando cruzamos ambos parentales de *K. lactis* con la interrupción $\Delta Kifus$, lo que nos indica que *KIFus1* participa en el proceso de apareamiento y que probablemente se requiera la presencia de *KIFus1* en ambos parentales para llevar a cabo la formación de los diploides. La formación remanente de diploides observada en estas cruza, así como también el hecho de que la cruza entre parentales de tipo silvestre en *S. cerevisiae* la baja temperatura (14 °C) no afecte considerablemente la formación de los diploides, nos permite proponer que *KIFus1* no es el único elemento que participa en la fusión de las células haploides. El proceso de apareamiento en *K. lactis* parece ser más sensible a esta condición, ya que cruza entre células de tipo silvestre a 14 °C dan como resultado una disminución en la formación de diploides. Esto nos da razones para pensar en la posibilidad de que algunas otras proteínas que todavía no conocemos participen en el proceso de formación del diploide. Un elemento que creemos pudiera sustituir el papel de *KIFus1* y así explicar el hecho de que la interrupción de *KIFus1* en ambos tipos parentales no elimine por completo la formación de diploides es el *KIFus2*. En la base de datos está reportada una secuencia de *K. lactis* (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000) que presenta una gran similitud con el gen *ScFus2* de *S. cerevisiae* (61.1 %). De existir el *KIFus2*, si este gen está involucrado en la fusión nuclear, y si es capaz de sustituir parcialmente la función de *KIFus1* es un punto a resolver en un futuro.

La definición del *ScFus1* como un elemento de respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* (Trueheart *et al.* 1987) estuvo determinada no solo por su papel en el apareamiento, sino también por el hecho de que su transcripción se activa cerca de 50 veces únicamente cuando la vía inducida por feromonas se encuentra prendida (McCaffrey *et al.*

1987). Una parte importante para terminar de definir al *KIFus1* como un elemento de la vía de respuesta a feromonas fue determinar su comportamiento en presencia del estímulo hormonal de la célula de sexo opuesto. La actividad transcripcional de este gen se induce (7.2 veces) cuando la feromona del sexo contrario está presente en comparación con la que tiene en condiciones de no-inducción. El hecho que *KIFus1* active su transcripción en respuesta a feromonas de apareamiento nos permite definirlo como un elemento de respuesta a feromonas en *K. lactis*, y el primero que se reporta para esta especie de levadura.

La recapitulación de todas las observaciones anteriores nos permiten definir a *KIFus1* como un elemento de respuesta a las feromonas de apareamiento que se requiere para la conjugación sexual, que codifica para una probable proteína de membrana cuya función podría estar involucrada de manera importante en el evento de la fusión membranal en *K. lactis*. Teniendo esto en mente, quisimos establecer las relaciones existentes entre el *KIFus1* y otros dos elementos del sistema de respuesta a feromonas en *K. lactis*. El primero sobre el que enfocaremos la discusión es *KISte12*.

Debido a que *KISte12* se clonó a partir de la complementación de una mutante Δ *ScSte12* y que se caracterizó por medio de experimentos realizados en *S. cerevisiae* (Yuan *et al.*, 1993) y no en su propio sistema, no teníamos la certeza del efecto o relación que pudiera tener en la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*, por lo que antes que cualquier otra cosa, nos enfocamos a probar este efecto basados en la información del estudio sobre *KISte12* y en su homología con el factor transcripcional *ScSte12* (Yuan *et al.* 1993). A grandes rasgos, *Ste12* en *S. cerevisiae* (*ScSte12*) es el factor transcripcional encargado de activar los genes que se requieren para la conjugación sexual de los gametos (Dolan *et al.*, 1989). Uno de estos genes es el *ScFus1* (Hagen *et al.*, 1991). La función de *Ste12* está regulada por los elementos que participan en la cascada de señales mediada por proteínas G en respuesta a las feromonas sexuales (Kronstad *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987) y su activación por esta vía de MAPKs constituye el paso previo a la transcripción de los genes que se inducen como consecuencia de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento (Kronstad *et al.* 1987; Trueheart *et al.* 1987; Song *et al.* 1991).

ScSte12 es un factor transcripcional modular presente en ambos tipos sexuales. Presenta tres regiones bien caracterizadas. La primera abarca del aminoácido 1 al 214 y está encargada del reconocimiento del sitio de unión al ADN. La segunda abarca del aminoácido 215 al 471 y corresponde al dominio de transactivación (Crosby *et al.* 2000), y la tercera abarca del aminoácido 472 al 688 y corresponde al dominio de interacción entre *ScSte12* y la proteína *Mcm1* (*ScMcm1*) (Errede y Ammerer, 1991) en el caso de las células α (Dolan *et al.*, 1989; Errede y Ammerer, 1991; Song *et al.*, 1991; Kirkman-Correia *et al.*, 1993; Crosby *et al.*, 2000). En la introducción hablamos del papel del dominio de unión al ADN en *ScSte12* y de que presenta una alta identidad con el posible sitio de reconocimiento al ADN de *KISte12*. Ahora bien, el sitio que es reconocido por el *ScSte12* para iniciar la transcripción de los genes que se activan en respuesta a feromonas de apareamiento en *S. cerevisiae* se conoce como secuencia PRE (del inglés "Pheromone Response Element") (Hagen *et al.*, 1991). *ScSte12* reconoce la secuencia TGAAAC, la cual fue definida como el elemento mínimo indispensable para que se active la transcripción de

los genes en respuesta a las feromonas de apareamiento (Sengupta y Cochran, 1990). Este elemento se encuentra en al menos dos o tres copias en el extremo 5' no codificante de los genes inducidos por feromona (Sengupta y Cochran, 1990). En este extremo también se encuentra localizada una secuencia, denominada PQ, la cual es reconocida por el factor ScMcm1 acoplado a la proteína Sc α 1, y que es importante, más no fundamental, para la transcripción de los genes inducidos por la feromona en las células de tipo sexual α de *S. cerevisiae* (Sengupta y Cochran, 1990). El elemento PRE de 6 nucleótidos se definió por medio de ensayos de protección a ADNasa utilizando la secuencia 5' no codificante del gen ScFus1 unida al ScSte12 (Hagen *et al.*, 1991). En un trabajo posterior, mediante estos mismos experimentos, se observó que K1Ste12 es capaz de unirse *in vitro* al elemento PRE de *S. cerevisiae* (Yuan *et al.*, 1993). Al ser K1Ste12 el primer gen que se relacionaba de manera indirecta con el apareamiento celular se buscó alguna secuencia parecida a la caja PRE de *S. cerevisiae* en la región 5' no codificante. Se encontró una secuencia parecida (TGTTTCAT) 356 pb corriente arriba de la secuencia K1Ste12 que podría cumplir la misma función en los genes involucrados en la respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis* (Yuan *et al.*, 1993). El hecho de que K1Ste12 complemente la función transcripcional de ScSte12 y que K1Ste12 sea capaz de unirse a secuencias específicas, definió a K1Ste12 como un factor transcripcional. Hablando en primer lugar de la propuesta de la secuencia TGTTTCAT como una caja PRE, diremos que, aunque no se encuentra reportado en la sección de "resultados", una parte del trabajo consistió en realizar una comparación entre los promotores de los genes que estamos estudiando en el laboratorio y que pensamos, forman parte de la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis*. Trabajando con la secuencia promotora de los genes: K1Fus1, K1Gpa1, K1Ste2, K1Ste4 y K1Ste18 no encontramos el elemento propuesto como PRE en K1Ste12. Aún más, no pudimos encontrar secuencia alguna que pudiéramos proponer como una caja PRE. En experimentos hechos en el laboratorio utilizando una fusión del promotor de K1Ste12 con el gen LacZ de *E. coli* no observamos actividad transcripcional en células haploides de *K. lactis* ni de *S. cerevisiae* expuestas a las respectivas feromonas de sexo contrario. Con estos datos sólo podemos pensar dos cosas. Primero, aunque K1Ste12 pueda reconocer la secuencia PRE de *S. cerevisiae in vitro* (Yuan *et al.*, 1993), los genes que activan su transcripción en respuesta a las feromonas en *K. lactis* tengan otro tipo de elementos regulatorios en su secuencia promotora. Segundo, que ScSte12 no reconoce los elementos PRE de *K. lactis*, ni putativos ni existentes, en el promotor de K1Ste12. Creemos que, toda vez que obtengamos el factor transcripcional K1Ste12 purificado y utilizando los promotores de estos mismos genes, podremos definir cual es la o las secuencias reconocidas por K1Ste12 mediante ensayos de protección a ADNasa.

Datos previos del laboratorio, además de los reportados sobre el estudio de K1Ste12 en el sistema de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* (Yuan *et al.*, 1993), sugirieron que probablemente K1Ste12 sea el factor transcripcional encargado de activar los genes en respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis* y que la activación de estos genes se lleva a cabo por elementos distintos a los PRE reportados para *S. cerevisiae*. Cuando expresamos una construcción que comprende 300 pares de bases de la secuencia promotora y 300 pb del marco de lectura abierto del gen ScFus1 fusionado con el gen LacZ de *E. coli* en células haploides de *K. lactis* en presencia de la feromona del sexo opuesto, no existe inducción (Lloret, 2000). La transcripción de esta construcción sólo se activa cuando en

estas mismas células co-expresamos el gen *ScSte12*. Debido a estos resultados pensamos que los elementos de la vía de respuesta a las feromonas en *K.lactis* son capaces de fosforilar a *ScSte12* y éste a su vez es capaz de activar la transcripción de *ScFus1*. Una segunda observación derivada de estos resultados muestran que *KISte12* es incapaz de activar la transcripción de *ScFus1*, aunque el dominio de unión a DNA de *KISte12* sea capaz de unirse a la secuencia PRE *in vitro* (Lloret, 2000).

En este trabajo sugerimos que *KISte12* se requiere para el apareamiento celular en *K. lactis*, ya que el proceso de apareamiento se ve afectado cuando uno de los tipos sexuales de *K. lactis* lleva la interrupción $\Delta KISte12$, y esto se refleja en la disminución drástica de la formación de diploides respecto a los que se obtienen de una cruce entre cepas silvestres. Esto también nos demuestra que el efecto de la interrupción es independiente del tipo sexual, por lo que pensamos que *KISte12* lleva a cabo la misma función en ambos sexos. Cuando sobreexpresamos *KISte12* en células haploides de *K. lactis* y las cruzamos con una cepa de sexo contrario, observamos un aumento en la formación de los diploides. El efecto de la sobreexpresión de *KISte12* en el proceso de apareamiento está relacionado con la dosis génica de *KISte12*, ya que observamos claramente un aumento considerable en la cantidad de ARN mensajero en estas células. Esta propuesta también está apoyada en el hecho de que las células haploides de *K. lactis* que llevan la interrupción $\Delta KISte12$ son incapaces de formar diploides, porque no hay mensajero y por lo tanto no hay proteína. Este efecto es comparable al causado por la sobreexpresión de *ScSte12* en *S. cerevisiae*, ya que en este caso, las células presentan un aumento en la formación de diploides (Dolan y Fields, 1990). También se determinó que la sobreexpresión de *ScSte12* en células haploides de *S. cerevisiae* es causa de la transcripción constitutiva de los genes que se activan en respuesta a feromonas (Dolan y Fields, 1990). Esto se demostró utilizando células haploides de *S. cerevisiae* que co-expresan *ScSte12* y una fusión del promotor de *ScFus1* con el gen *LacZ* de *E. coli* (Dolan y Fields, 1990). Nosotros observamos que en el caso de *K. lactis*, la sobreexpresión de *KISte12* parece causar un efecto similar, ya que la diferencia en la actividad transcripcional de *KIFus1* cuando sobreexpresamos *KISte12* en células haploides de *K. lactis* transfectadas con la fusión *KIFus1-LacZ*, es equivalente a la actividad que presenta *KIFus1* en células haploides inducidas únicamente con la feromona del sexo contrario. A este efecto podemos agregar el hecho de que, en ausencia de *KISte12*, *KIFus1* no se transcribe. Esto lo observamos en la localización de *KIFus1* fusionado con la Gfp en *K. lactis*. En células haploides de *K. lactis* que llevan la interrupción $\Delta KISte12$ no se presenta la localización de la fluorescencia en la periferia celular que observamos cuando estas mismas células son transfectadas con el *KISte12* y en células de tipo silvestre que sobreexpresan *KISte12*. Estos datos en su conjunto nos llevan a proponer que, en *K. lactis*, *KISte12* es el factor transcripcional que activa a *KIFus1*, el cual es un elemento de respuesta a feromonas de apareamiento que se requiere para el proceso de conjugación sexual, y que por lo tanto *KISte12* y *KIFus1* forman parte de la misma vía.

Aunque los siguientes datos no fueron presentados en este trabajo, debido a que los resultados obtenidos no se relacionan de una manera clara con la respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*, tema principal que nos ocupa, creemos importante mencionar otros estudios que hicimos sobre *KISte12*, ya que esto posiblemente permita ampliar la información que se tiene sobre la función de este factor transcripcional en otro evento

celular en *K. lactis*. Hemos visto que la comparación de Ste12 entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*, nos indica que ambos factores tienen, en general, la misma función en ambas especies. Asimismo se ha reportado que la actividad transcripcional de ScSte12 no sólo se circunscribe a la respuesta a feromonas de apareamiento, sino que también está involucrada en el crecimiento filamentosos en *S. cerevisiae* (Breitkreutz *et al.*, 2001). Este tipo de crecimiento se presenta cuando las células no tienen fuentes de nitrógeno y/o se crecen en un medio con fuentes fermentables de carbono, y se caracteriza por la diferenciación en la morfología de células hacia cadenas compuestas de células alargadas y delgadas que crecen de forma radial a partir de la colonia en medio sólido, penetrando el agar (Roberts y Fink, 1994; Breitkreutz, *et al.*, 2001). Esta respuesta utiliza los mismos elementos de la vía de MAPKs en respuesta a feromonas sexuales (Mosch *et al.*, 1996; Gancedo, 2001). El estado funcional de ScSte12 en uno u otro evento está determinado por una fosforilación diferencial (Roberts y Fink, 1994; Olson *et al.*, 2000). La discriminación entre las dos vías está dada por la fosforilación de ScSte12 por dos proteínas: ScFus3, en el caso de la respuesta a feromonas (Couve y Hirsch, 1996), y ScKss1 en el caso del crecimiento pseudohifal (Breitkreutz *et al.*, 2001). Cuando el multicomplejo formado por las proteínas ScSte5, ScSte11, ScSte7 y ScFus3 fosforila a ScSte12, este se une al factor transcripcional ScMcm1, y esto le permite reconocer los genes involucrados en el proceso de apareamiento, mientras que, cuando en lugar de ScFus3 está unido ScKss1, ScSte12 fosforilado es capaz de unirse a un factor transcripcional llamado ScTec1, y este heterodímero activa los genes involucrados en la respuesta pseudohifal (Lengeler *et al.*, 2000). En la comparación entre los promotores de los genes *KIFus1*, *KIGpa1*, *KISte2*, *KISte4* y *KISte18*, aunque no pudimos encontrar elementos con una posible función a la de la caja PRE en *S. cerevisiae*, pudimos observar la presencia de cajas tipo GATA y Gcn4 en todos ellos, las cuales son características de los promotores de los genes involucrados en el catabolismo de nitrógeno y que se activan cuando las células se crecen en malas fuentes de nitrógeno. Este proceso está bien estudiado en *S. cerevisiae* (Hofman, 1999; Soussi-Boudekou y André, 1999), y también en otros hongos como *Neurospora crassa* (Yuan y Marzluf, 1992), *Aspergillus nidulans* (Burger *et al.*, 1991) y *Tolypocladium inflatum*, hongo productor del antibiótico ciclosporina (Kempken y Kuck, 2000). Las curvas de crecimiento de células haploides de *K. lactis* con la interrupción $\Delta Kiste12$ muestran una ligera diferencia en el tiempo de crecimiento respecto a las células de tipo silvestre; sabemos también que la actividad transcripcional de *KIFus1* se ve ligeramente disminuida en presencia de malas fuentes de nitrógeno (prolina o GABA) y en presencia de 3AT, el cual es un inductor de la transcripción de los genes *via* Gcn4p (Hofman, 1999; Soussi-Boudekou y André, 1999). Las cruces entre cepas silvestres de distinto tipo sexual de *K. lactis* realizadas en medios con distinta fuente de nitrógeno (amonio, glutamina, prolina y GABA) dieron como resultado un mayor número de diploides en las cruces hechas en presencia de buenas fuentes de nitrógeno (amonio o glutamina) que los formados en las cruces hechas en presencia de malas fuentes de nitrógeno (prolina o GABA). El apareamiento también disminuyó cuando las células haploides de tipo silvestre se apareaban en presencia de rapamicina, un fármaco inmunosupresor que promueve la activación de los genes involucrados en la respuesta a catabolismo nitrogenado mediante la activación y localización nuclear del factor transcripcional tipo GATA Gln3, *via* la proteína cinasa Tor1 (Beck y Hall, 1999; Cárdenas *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001). La presencia de las cajas GATA y Gcn4 en los promotores de los genes involucrados en la respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*, el efecto aparente de la fuente de

nitrógeno durante el proceso de conjugación, así como también las ligeras diferencias en la actividad transcripcional de *KIFus1* en condiciones de inducción para los genes involucrados en el catabolismo de nitrógeno, nos hacen pensar que probablemente este proceso utilice elementos de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento y/o que el tipo de fuente de nitrógeno que se encuentre en el medio tenga un efecto sobre el proceso de apareamiento mediante una vía alterna que involucre la relación entre elementos del sistema de respuesta a feromonas y el catabolismo de nitrógeno en *K. lactis*. Esto no parecería tan improbable, ya que en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, el proceso de apareamiento está determinado por dos señales externas, la presencia de la feromona de tipo sexual contrario y de la privación de nitrógeno o glucosa en el medio (Davey, 1998; Lengeler *et al.* 2000) mientras que en *S. cerevisiae* muchos de los elementos de respuesta a las feromonas se encuentran involucrados en el crecimiento pseudohifal, causado por privación de nutrientes en el medio (Legeler *et al.*, 2000). Como veremos un poco más adelante, la vía de transducción de señales en respuesta a las feromonas de apareamiento en *K. lactis* pareciera tener semejanzas con los sistemas de transducción involucrados en la conjugación sexual tanto de *S. cerevisiae* como de *S. pombe*. Sin embargo, hasta el momento no tenemos la suficiente evidencia para afirmar si *KISte12* o cualquier otro elemento de la vía de respuesta a feromonas se encuentra relacionado con el proceso de catabolismo de nitrógeno en *K. lactis* o viceversa.

En el establecimiento de la relación entre los elementos *KIFus1*, *KISte12* y *KIGpa1*, hasta este punto nos queda claro que la activación transcripcional de *KIFus1* se debe al factor *KISte12* y que ambos elementos se requieren para el proceso de conjugación sexual en *K. lactis*. Hemos visto también a lo largo de esta discusión que ambos elementos son homólogos a los descritos en *S. cerevisiae*. Por esto, podemos sugerir que, en *K. lactis*, tanto *KISte12* como *KIFus1* se encuentran posicionados corriente abajo del transductor de la señal, que tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae* es la proteína G heterotrimérica acoplada al receptor de la feromona del sexo contrario (Kurjan, 1990; Saviñón *et al.*, 2001).

S. cerevisiae expresa sólo dos subunidades de tipo G α . La primera, llamada *ScGpa1* está involucrada en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento, mientras que la segunda, llamada *ScGpa2*, participa en la vía de señalización en respuesta a privación de nutrientes, en la regulación de los niveles de AMP cíclico y por lo tanto en el crecimiento pseudohifal (Kubler *et al.*, 1997; Nakafuku *et al.*, 1988). *K. lactis* presenta dos subunidades de la proteína G heterotrimérica de tipo Gpa, *KIGpa1* y *KIGpa2*. *KIGpa2*, al igual que su homóloga en *S. cerevisiae*, está involucrada en la regulación de los niveles de AMP cíclico (Saviñón *et al.*, 1996). La subunidad *ScGpa1* en *S. cerevisiae* actúa como un modulador negativo de la vía de respuesta a feromonas (Nakayama *et al.*, 1988). Por el contrario, en *K. lactis* *Gpa1* parece ser responsable de transducir la señal (Saviñón *et al.*, 2001). En *S. cerevisiae* se reportó que la interrupción $\Delta Scgpa1$ en células haploides da como resultado la activación constitutiva de la vía de respuesta a feromonas y, al interrumpirse el ciclo celular en la fase G₁ de forma permanente, esta mutación da como resultado células inviables (Jahng *et al.*, 1988). En *K. lactis*, las células haploides que portan la interrupción $\Delta Klgpa1$ son viables y presentan una reducción en la formación de diploides de 20 veces, en comparación con los diploides obtenidos en la cruce hecha entre células de tipo silvestre; por estos datos se propuso que *KIGpa1* tiene un papel positivo en la transducción de

señales activada por feromonas de apareamiento (Saviñón *et al.*, 2001). El hecho de que la subunidad Gpa1 sea un modulador positivo en la cascada de respuesta a feromonas se ha reportado en la levadura *S. pombe*, así como en los hongos basidiomicetos *Ustilago maydis* (Regenfelder *et al.*, 1997) y *Cryptococcus neoformans* (Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 1998).

En el laboratorio tenemos un alelo de *KIGpa1* (*KlGpa1*^{Q298L}) con una deficiencia en su actividad intrínseca de GTPasa que cuando se expresa en células haploides de *K. lactis*, causa un retraso en el crecimiento de las mismas. Este efecto en el crecimiento de reportó en células de *S. cerevisiae* que expresan un alelo de *ScGpa1* deficiente en su actividad de GTPasa, ya que en este caso el dímero $\beta\gamma$ está libre y transduce la señal (Dolhman *et al.*, 1996). En los cultivos hechos con células de *K. lactis* transfectedas con el alelo *KlGpa1*^{Q298L} se observa la aparición de morfologías similares a las que presentan las células haploides cuando se incuban en presencia de la feromona producida y secretada por la célula del sexo contrario, las cuales pueden observarse en las microfotografías presentadas en este trabajo (fig 25). Estas mismas células con proyecciones no se observan en cultivos de una cepa que lleve la interrupción $\Delta KlGpa1$. El alelo *KlGpa1*^{Q298L} también es capaz de restituir el proceso de formación de diploides, así como también causar la reaparición de las células con proyecciones cuando se expresa en una cepa que lleva la interrupción $\Delta KlGpa1$. Basados en el papel positivo asignado a *KIGpa1* en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento, podemos deducir que este cambio en la morfología es causado por la activación de la misma y pensamos que el retraso en el crecimiento pudiera deberse al arresto de las células en la fase G₁ del ciclo celular.

La activación transcripcional de *KIFus1* causada por la presencia del alelo *KlGpa1*^{Q298L} nos indica que *KIFus1* y *KIGpa1* forman parte de la misma vía. Sabemos también que la transcripción de *KIFus1* depende de *KlSte12*. Nuestros resultados indican que cuando *KlSte12* no está presente en la célula *KlGpa1* no puede activar la transcripción de *KIFus1*, ni formar las proyecciones. Tampoco es capaz de complementar una mutante $\Delta Klste12$, por lo que podemos establecer la relación entre *KlSte12* y *KlGpa1* y sugerir que estos dos elementos se encuentran involucrados en el mismo sistema. Si tomamos esta suposición y la conjugamos con los hechos derivados de los experimentos descritos hasta este punto, podemos plantear que *KlGpa1*, *KlSte12* y *KIFus1* son elementos de la misma vía de transducción de señales en respuesta a feromonas sexuales y que se requieren para el proceso de conjugación sexual.

El hecho de que las proyecciones en células de *K. lactis* se formen cuando son expuestas a la feromona del sexo contrario o cuando se expresan elementos que la activan, como el *KlSte12* o *KlGpa1*, mientras que cuando estos elementos están ausentes no se forman, nos sugiere que este evento es causado directamente por la activación de la vía de transducción de señales en respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*. El proceso de diferenciación morfológica causado por la activación de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento está bien documentado en *S. cerevisiae* (van Drogen *et al.*, 2001; Breikreutz *et al.*, 2001). El estado shmoo puede observarse en las células haploides tratadas con feromona de tipo sexual contrario o por células que expresan un alelo de *ScGpa1* con una deficiencia en su actividad intrínseca de GTPasa en ausencia del estímulo

(Kurjan *et al.*, 1991). Como se explicó anteriormente, el cambio en la morfología en *S. cerevisiae* depende no sólo de la activación de la cascada de respuesta a feromonas, sino también de las interacciones entre elementos de esta vía y proteínas involucradas en el arresto celular en la fase G₁ del ciclo, suspensión del proceso de gemación, reorganización del citoesqueleto y el crecimiento polarizado de la célula para establecer el punto por el cual se llevará a cabo la fusión de los gametos para formar el diploide (Hasek *et al.*, 1987; Baba *et al.*, 1989; Gehrung y Snyder, 1990; Barnes *et al.*, 1990; Meluh y Rose, 1990; Snyder *et al.*, 1991). Por tanto, el cambio de morfología celular implica el establecimiento de la maquinaria que permite la fusión membranal y nuclear de los gametos por la interacción entre elementos de la cascada de respuesta a feromonas de apareamiento y del proceso de gemación. (Sprague y Thorner, 1992; Zheng *et al.*, 1995; Hasek *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997). El cambio en la morfología, resultado de la activación de la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento está reportado también para *S. pombe*. (Davey, 1998;). En el caso de que *S. pombe* esté en un medio limitado en nutrientes y su vía de respuesta a feromonas de apareamiento esté activada por la presencia de la feromona del sexo contrario, orienta su polaridad, aparentemente en respuesta al gradiente de feromona producida por la célula del otro sexo (Niccoli y Nurse, 2002). A diferencia de *S. cerevisiae*, las células que presentan el arresto celular en la fase G₁ del ciclo incrementan su tamaño, dirigiendo su crecimiento hacia la fuente de feromona de sexo contrario (Davey, 1992). Este crecimiento quimiotrópico da como resultado la formación de un shmoo y, como en *S. cerevisiae*, la fusión membranal y nuclear se lleva a cabo por el punto de unión de las proyecciones formadas por las células de sexo contrario (Petersen *et al.*, 1995). La maquinaria que controla y determina la morfología en *S. pombe* involucra a dos GTPasas. Una de ellas es la proteína de tipo Rho *SpCdc42*, cuyo homólogo en *S. cerevisiae* ya vimos que se encuentra relacionado con la selección del sitio por donde se va a formar la proyección. La otra es la proteína monomérica *Ras1* (*SpRas1*), que pertenece a la familia de GTPasas pequeñas. Cuando *SpRas1* tiene unido un GTP se une a la proteína *Ral1* (*SpRal1*, también conocida como *Scd1*), homóloga a la proteína *Cdc24* de *S. cerevisiae* (Chang *et al.*, 1994). *SpRal1* es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que regula a *SpCdc42* (Chang *et al.*, 1994). La unión entre *SpRal1* y *SpRas1* promueve la activación de *SpCdc42*. *SpCdc42* se une entonces a la proteína *Shk1* (*SpShk1*), homóloga a la proteína cinasa *Ste20* de *S. cerevisiae* (Marcus *et al.*, 1995). *SpShk1* se une a su vez a la proteína *Byr2* (*SpByr2*), homóloga a la proteína *Ste11* de *S. cerevisiae* (Tu *et al.*, 1997). La estabilidad del complejo *Ral1-Cdc42-Ras1-Shk1-Byr2* en *S. pombe* se piensa que está regulado por la proteína *Ral3* (*SpRal3*, también conocida como *Scd2*), homóloga a la proteína *Bem1* de *S. cerevisiae*, y tiene dos dominios de tipo SH3 (Chang *et al.*, 1994), que como mencionamos anteriormente, están involucrado en el establecimiento de complejos multiproteicos. Los datos que sugieren estas interacciones fueron obtenidos a partir de análisis de epsitasis, aproximaciones bioquímicas y por medio del ensayo del doble híbrido. Ahora, se hipotetiza que este multicomplejo marca el lugar donde se lleva a cabo el crecimiento polarizado, ya que en este lugar se concentran parches corticales de F-actina, los cuales son importantes para la localización de la proteína *SpFus1* en la punta de la proyección. En experimentos donde se crecieron células de *S. pombe* en condiciones de privación de nutrientes y en presencia de la feromona del sexo contrario, y que fueron tratadas con el fármaco Latrunculina-A, se observó que las células presentan deficiencias en el proceso de fusión membranal (Petersen *et al.*, 1998a). También se sabe que la proteína *SpFus1* es citoplásmica, y que aunque carece del dominio SH3 presente en la proteína

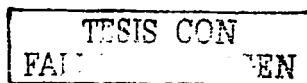
ScFus1, tiene dominios de tipo FH3 (Petersen *et al.*, 1998b), por lo que pertenece a la familia de las forminas. Estas proteínas se encuentran involucradas en varios procesos de diferenciación celular y se caracterizan por tener secuencias ricas en prolinas que son reconocidas por los dominios SH3 (Chan *et al.*, 1996). Así pues, al parecer, el dominio SH3 de Fus1 en *S. cerevisiae* se requiere para interactuar con el complejo que marca el sitio por donde se va a llevar a cabo la fusión del sitio, mientras que el sitio FH3 de Fus1 en *S. pombe* sirve para que sea reconocido por la maquinaria que marca este sitio. En ambos casos se comparte el hecho de que cada uno de estos dominios interactúa con el citoesqueleto y la re-orientación del mismo durante el proceso de apareamiento es importante para su localización.

Basados en todo lo anterior pensamos que la formación de las proyecciones en células de *K. lactis* esta relacionada con la activación de la vía de respuesta a las feromonas. Esta remodelación del citoesqueleto en presencia de la feromona del sexo contrario o la activación constitutiva de la vía también se ha observado durante el proceso de conjugación sexual en dos especies de levaduras alejadas filogenéticamente; *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

En general hemos visto que, tanto en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, los elementos que participan en la propagación vegetativa (*S. cerevisiae* y *K. lactis* se reproducen por gemación mientras que *S. pombe* lo hace por fisión), son los mismos que están involucrados en el remodelamiento del citoesqueleto durante el proceso de la conjugación sexual.

Sabemos que *K. lactis* tiene una relación filogenética más cercana con *S. cerevisiae* y no tan alejada de *S. pombe* como la relación que existe entre estas dos últimas especies de levadura. Las últimas dos especies presentan una localización de sus proteínas Fus1 en la punta de las proyecciones por donde se lleva a cabo el proceso de la fusión membranar. Por ello, podemos suponer que la ubicación preferencial de KIFus1 en los cuellos de las células que forman las proyecciones sea producto de la interacción de los elementos involucrados en el remodelamiento del citoesqueleto. La distribución de KIFus1 en las células que no presentan un crecimiento polarizado nos permite suponer dos cosas: que este sitio no está determinado, y que por lo tanto la proteína se ubique en la periferia, o que, aunque la secuencia del extremo amino sea suficiente como para determinar su destino, la célula no esté en la etapa donde permita la ubicación específica de esta proteína en algún punto. Una tercera posibilidad es que el sitio sea definido en forma posterior al contacto célula-célula.

Por esto, proponemos que en *K. lactis*, la localización de Fus1 podría depender de tres factores: la reorganización del citoesqueleto que indica el estado de diferenciación morfológica, la interacción de los elementos de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento por medio del dominio SH3 presente en la secuencia primaria de esta proteína, que le permite ya sea interactuar con el citoesqueleto de actina para ser localizado y/o mediar el mantenimiento del complejo multiproteico que señala el sitio de fusión que funciona como punto de referencia para la localización de otras proteínas involucradas en el proceso y por último, el posible papel del extremo amino como péptido señal.



Haciendo una recapitulación de los datos de este trabajo podemos proponer un modelo de la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis* (fig. 27). En este modelo, el receptor de la feromona (*K/Ste3*) tiene acoplada una proteína G heterotrímica, que pensamos está encargada de mediar la respuesta a las feromonas en *K. lactis*. Mediante experimentos de doble híbrido hemos podido determinar que las subunidades $G\alpha$ (*K/Gpa1*) y $G\beta$ (*K/Ste4*) interactúan con el extremo carboxilo terminal del receptor *K/Ste3* y también entre ellos. Por la evidencia que tenemos en el laboratorio sabemos que mutantes en *K/Gpa1* presentan un fenotipo estéril (Saviñón *et al.*, 2001; Durán-Avelar *et al.*, 2001). Cuando el receptor de la feromona está interactuando con su ligando, la subunidad α de la proteína G heterotrímica es la responsable de transducir la señal. Esto se apoya en que la versión constitutiva de *K/Gpa1* es capaz de activar la cascada y también en que en ausencia de esta subunidad las células no puede formar el diploide. Sobre el papel del dímero $\beta\gamma$ sólo podemos especular acerca de su función en la transducción de la señal. Sabemos que una mutante que lleva una interrupción en el gen *K/Ste4*, que codifica para la subunidad $G\beta$, es viable y presenta una disminución en el apareamiento. Esto sugiere que al menos la subunidad $G\beta$ está involucrada en la transducción de la señal. De ser esto cierto, entonces la subunidad $G\beta$ junto con la subunidad $G\alpha$ serían los componentes de la proteína G implicadas en la vía. Sobre el papel de la subunidad $G\gamma$ (*K/Ste18*) en la señal solo podemos decir que, hasta el momento, no hemos visto que su interrupción tenga un efecto sobre el apareamiento. En el laboratorio se está trabajando en este momento para clarificar el papel de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ como mediadores en la transducción de la vía de respuesta a feromonas.

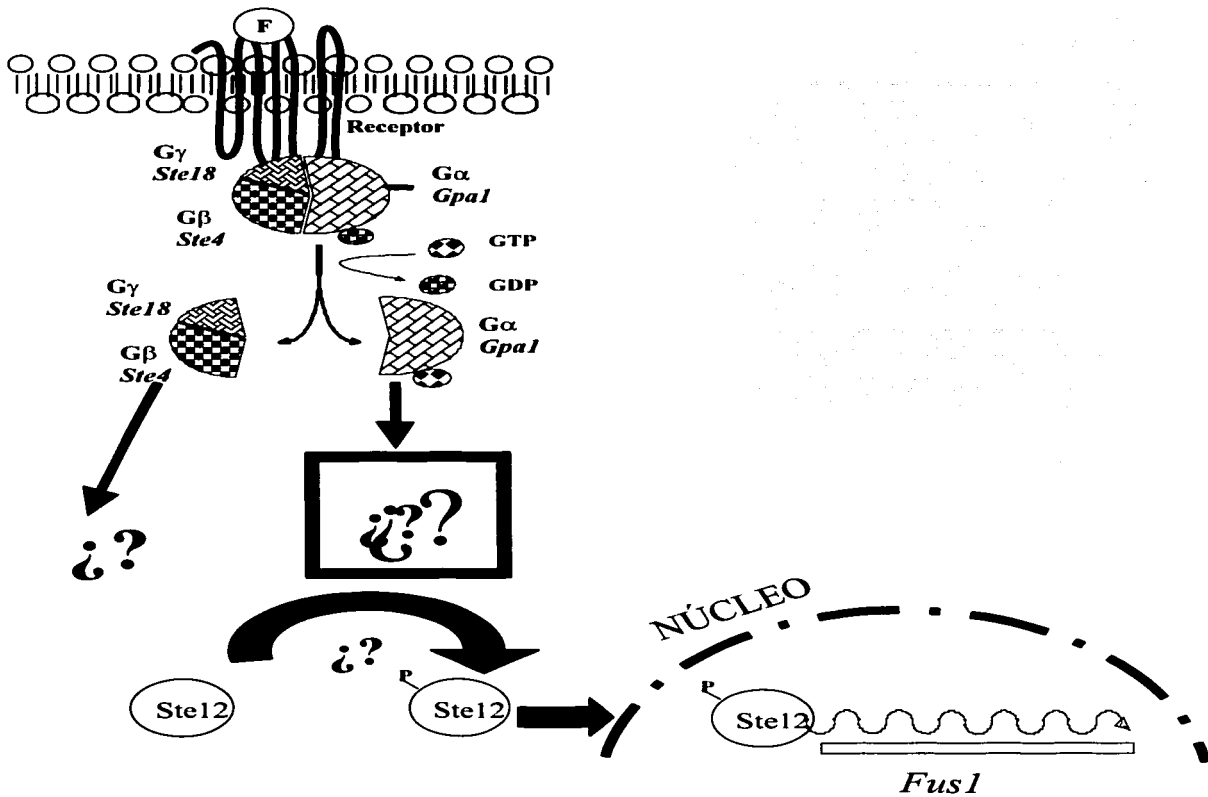


Figura 27. Transducción de señales en respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*

¿A quién transduce la señal *KIGpa1*? Sólo podemos especular; hemos visto que no importando que la subunidad α , en el caso de *S. pombe*, o el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G sean los encargados de transducir la señal, el efector inmediato siempre es una MAPK de tipo serina/treonina. En *K. lactis* se ha reportado la secuencia homóloga a la cinasa Ste20 de *S. cerevisiae* (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000) que participa en la vía de respuesta a las feromonas de apareamiento (Drogen *et al.*, 2000). En *S. pombe* tenemos también la intervención de la cinasa *SpShk1*, que junto con la *SpGpa1* activan a la MAPK *Byr2* (Lengeler *et al.*, 2000). En ambas especies, tanto *ScSte20* como *SpShk1* son MAPKs de tipo serina/treonina. Esto, junto con el hecho de la homología encontrada hasta el momento entre los elementos descritos para *S. cerevisiae* y *K. lactis*, nos hace pensar que *KiSte20* es un buen candidato para ser el efector de *KIGpa1*. Todavía no sabemos si el paso siguiente de la señal requiere de la formación de un multicomplejo de MAPKs como el Ste5-(Ste11-Ste7-Fus3) en el caso de *S. cerevisiae* (Konopka y Fields, 1992), o de la relación lineal de MAPKs individuales como en el caso de *S. pombe*, donde la señal se transmite en el siguiente orden: *SpByr2* → *SpByr1* → *SpSpk1* (Lengeler *et al.*, 2000). Sin embargo, podemos suponer que la vía de transducción de la respuesta a feromonas en *K. lactis* está compuesta de MAPKs, ya que los elementos que integran esta vía se encuentran conservados no sólo en *S. pombe* y *S. cerevisiae*, sino en varios organismos, desde levaduras hasta humanos (Lengeler *et al.*, 2000). Independiente del número de elementos que integren esta parte de la cascada de señales en *K. lactis*, al final el resultado es la activación de un factor que se encarga de transcribir los genes necesarios para la conjugación celular. En el caso de *S. pombe*, la activación del factor Ste11 requiere de la fosforilación por parte de la proteína *SpSpk1* y su función está condicionada a que no sea reprimido por altos niveles de AMP cíclico (esto quiere decir que la célula está en condiciones ricas de nutrientes). No importa que la feromona del sexo contrario esté activando la señal, puesto que el apareamiento sólo se da cuando los niveles de AMP cíclico son bajos, lo que indica una privación de nutrientes y por lo tanto la célula inicia su proceso de apareamiento (Davis, 1998). En el caso de *S. cerevisiae* se ha reportado que el estado de fosforilación de Ste12 por parte del módulo Ste5-(Ste11-Ste7-Fus3) (Dolan y Fields, 1990) es el que determina la activación de los genes encargados de la conjugación sexual en respuesta a feromonas sexuales, como el *ScFus1* (Trueheart *et al.*, 1987), y el proceso de apareamiento en esta levadura es independiente de las condiciones nutricionales del medio (Lengeler *et al.*, 2000). En *K. lactis* sabemos que *KiFus1* requiere de *KiSte12* para ser activado, y por la evidencia que tenemos podemos pensar que este proceso es igual al que sucede en *S. cerevisiae*. En nuestro modelo para *K. lactis*, la transcripción de los genes requeridos para la fusión celular (*KiFus1*) por parte del factor transcripcional *KiSte12* sería el último paso de la vía de transducción.

KiFus1 es el primer gen reportado para *K. lactis* que se activa por medio de esta vía, y su transcripción depende de al menos dos elementos de la cascada, *KIGpa1* y *KiSte12*. La función de *KiFus1* está posiblemente involucrada en la fusión membranal de las células de tipo sexual contrario para formar el diploide, ya que no sólo puede complementar parcialmente a una mutante $\Delta Scfus1$ sino también presenta en teoría características estructurales muy semejantes a *ScFus1*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque en *S. pombe* SpFus1 es citoplásmica, y en *S. cerevisiae* ScFus1 es membranal (y muy probablemente, KIFus1 también), ambas especies comparten el hecho de que la ubicación de la proteína Fus1 en un punto específico es importante para que se lleve a cabo el proceso de fusión y esta ubicación depende en gran parte de la sincronización de dos procesos, el remodelamiento del citoesqueleto y la respuesta a feromonas de apareamiento. La evidencia que tenemos pareciera indicar que en *K. lactis* estos dos procesos también están sincronizados, ya que en las células que forman las proyecciones, presuntamente por la activación de la vía de respuesta a feromonas, la distribución de KIFus1 se observa preferentemente hacia la punta de la misma. Aunque no tenemos evidencia de que el sitio SH3 presente en el extremo carboxilo de KIFus1 interactúe con el citoesqueleto de la misma forma que ese dominio en ScFus1 (o el dominio FH3 en el caso de *S. pombe*), podemos suponer que esta interacción se lleva a cabo debido al alto porcentaje de identidad entre ambas proteínas en esa región. En el caso de la ubicación de KIFus1 también podemos agregar que parece estar también determinada por el extremo amino terminal, o al menos por los primeros 88 aminoácidos. Ahora, en la respuesta a feromonas de apareamiento, tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*, el remodelamiento del citoesqueleto da como resultado la formación de proyecciones en las células de ambos tipos sexuales, y en la punta de la proyección, donde se establece el punto de contacto entre ambas células, es por donde se lleva a cabo la fusión celular. En *K. lactis* comenzamos apenas a describir la formación de las proyecciones en la respuesta a feromonas, pero hasta el momento no sabemos que tan importante sea su formación, por lo que con esta información comparándola con el proceso que ocurre en *S. pombe* y *S. cerevisiae* solo nos permite sugerir que también sea un requerimiento en *K. lactis* para establecer el punto de contacto y llevar a cabo la fusión celular.

Si las condiciones nutricionales, como el tipo de fuente de nitrógeno, tienen un efecto en el proceso de apareamiento en *K. lactis* todavía no lo sabemos. Para responder la incógnita de si las condiciones del medio donde se desarrolla *K. lactis* pudieran tener alguna influencia en los procesos que regulan su apareamiento, tal como sucede en *S. pombe* o que estas condiciones sean independientes para el apareamiento como en *S. cerevisiae*, tenemos que tomar en cuenta la diferencia en el tipo de vida que presentan estas dos últimas especies. Se cree que *S. cerevisiae* ha evolucionado para mantenerse en estado diploide en la naturaleza, mientras que *S. pombe* se mantiene en estado haploide (Leberer *et al.*, 2000). Esto explica el porque en condiciones de privación de nutrientes el diploide de *S. cerevisiae* desarrolla el crecimiento pseudohifal o entra en meiosis y esporula, mientras que *S. pombe* en estas mismas condiciones, primero se aparean para formar el diploide, luego entra en meiosis y esporula. Esta diferencia en su ciclo de vida se tradujo, en un sentido evolutivo, en el desarrollo de un solo sistema de señales para el apareamiento en *S. cerevisiae* y la coordinación de dos para *S. pombe*. *K. lactis*, a diferencia de *S. cerevisiae*, se encuentra en la naturaleza en estado haploide y el estado diploide es muy inestable, tal como en *S. pombe*. Tomando en cuenta esta característica tan sencilla en apariencia, podríamos explicarnos por que *K. lactis* comparte características de los sistemas de transducción de señales con ambas especies.

Como *K. lactis* no depende estrictamente de la privación de nutrientes para iniciar su proceso de apareamiento, podemos suponer que en esta especie la conjugación esté regulada principalmente por una sola vía tal como en *S. cerevisiae*. La vía que se encargue

de monitorear las condiciones nutricionales del medio en *K. lactis* sería independiente de la vía que regula el apareamiento. Sin embargo, la evidencia que tenemos sobre la influencia de la fuente de nitrógeno sobre el apareamiento, la inestabilidad del estado diploide y el estado haploide en el que encontramos preferencialmente a *K. lactis* en la naturaleza nos hace pensar que estas dos vías pudieran estar muy relacionadas, al grado de que, aunque no sean co-dependientes en sentido estricto, tal como ocurre en *S. pombe*, los elementos que las integran presenten una interacción a niveles más básicos y/o compartan los elementos comunes de regulación. El nivel en el cual se relacionan y/o regulan, si existe, todavía no es claro. Sin embargo podemos proponer dos elementos para relacionar estos procesos: uno involucrado en el proceso de apareamiento y el otro en la regulación de los niveles de AMP cíclico en *K. lactis*.

Sabemos que *K. lactis* tiene dos subunidades de tipo α , *K1Gpa1* y *K1Gpa2*. *K1Gpa2* está involucrado en la regulación de los niveles de AMP cíclico en *K. lactis* (Saviñón *et al.*, 1996). Aunque las células que llevan una interrupción en el gen *K1Gpa2* pueden aparecerse casi a los mismos niveles que los que presenta una cruce entre cepas silvestres de tipo sexual opuesto, cuando se sobreexpresa *K1Gpa2* en células haploides de tipo silvestre, el apareamiento se ve seriamente disminuido. Esto llevó a la propuesta de que, si bien *K1Gpa2* no participa en el proceso de apareamiento, es capaz de interferirlo parcialmente. Como hemos visto, los niveles de AMP cíclico es una señal regulatoria que en *S. pombe* permite o reprime el apareamiento, mientras que en *S. cerevisiae* es una señal para el crecimiento pseudohifal. Con esto nos quedamos con la idea de que probablemente los niveles de AMP cíclico, regulados por *K1Gpa2*, influyen en el proceso de apareamiento. El otro elemento que pensamos pudiera ser punto de convergencia y/o regulación entre estas dos vías es *K1Ste12*, ya que se ha visto que la fosforilación diferencial de este factor permite la transcripción de genes involucrados en el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae* en respuesta a bajas concentraciones de nitrógeno o altas concentraciones de fuentes de carbono fermentables. El hecho de que *K1Ste12* presente características muy semejantes con *ScSte12* nos hace pensar que, aunque hasta el momento no hemos observado crecimiento pseudohifal en *K. lactis*, la actividad de *K1Ste12* pudiera ser regulada por elementos de la vía que perciba la privación de nutrientes, tal y como sucede con el factor *Ste11* de *S. pombe*, cuya actividad transcripcional se reprime por elementos de la vía activada en respuesta a privación de nutrientes. En cuanto al posible regulador, manejamos dos propuestas. La primera es una MAPK del tipo de *ScKss1*, cuya secuencia parcial se encuentra reportada (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000). Esto sería congruente si es que en *K. lactis* la transducción de la señal ocurre por medio de un módulo de MAPKs como el que recluta *ScSte5*. La segunda propuesta para la identidad de este regulador es un factor tipo GATA del tipo *ScGln3* o *ScGat1*, o un factor de tipo *ScGcn4* que podría co-activar o reprimir la transcripción de los genes de respuesta a feromonas en *K. lactis* en presencia de malas fuentes de nitrógeno. Esta propuesta se basa en la presencia de cajas que son reconocidas por factores que activan la transcripción en respuesta a catabolismo nitrogenado en *S. cerevisiae* (*Gcn4* o *Gln3*), en las secuencias promotoras, no sólo de *K1Ste12*, sino también de los genes *K1Gpa1* y *K1Fus1* reportados aquí como elementos de la vía de respuesta a feromonas, además de los genes que hemos clonado y que posiblemente también sean parte de la cascada. Hasta este momento sólo hemos podido clonar la secuencia completa del probable factor GATA *K1Gln3* y pensamos trabajar en un futuro

sobre el efecto probable que tenga la interrupción en este gen en el proceso de apareamiento en *K. lactis*.

De existir el entrecruzamiento de estas vías en *K. lactis*, pensamos que este se llevaría a cabo en alguno o todos los siguientes niveles: *K/Gpa2*, los activadores transcripcionales en respuesta a catabolismo nitrogenado, el factor *K/Ste12* o cualquier otro elemento de la vía aún no descrito. Entonces estaríamos hablando de que probablemente en esta levadura las cascadas de señalización que son activadas por la privación de nutrientes y la respuesta a feromonas están relacionadas (o inter cruzadas) de manera más íntima (o a niveles más básicos) que en *S. cerevisiae*. Esto sin llegar a presentar el grado de interdependencia a las dos condiciones que muestra *S. pombe*.

“Cuando el hombre ha derrotado a su segundo enemigo, puede hacer lo que se le antoje. Su deseo es la regla. Ve claro y parejo todo lo que hay alrededor. Así, ha tropezado con su tercer enemigo ¡El poder!”

“El poder es el más fuerte de todos los enemigos, y naturalmente lo más fácil es rendirse; después de todo, el hombre es de veras invencible. El manda, empieza tomando riesgos calculados y termina haciendo reglas, porque es el amo del poder. Un hombre en esta etapa apenas advierte que su tercer enemigo se cierne sobre él. Y de pronto, sin saber, habrá perdido la batalla. Su poder lo habrá transformado en un hombre cruel y caprichoso”

“Un hombre vencido por el poder muere sin saber realmente como manejarlo. El poder es solo una carga sobre su destino. No tiene dominio de sí mismo, ni puede decir como ni cuando utilizará su poder”

“Para vencerlo, debe desafiarlo con toda intención. Tiene que llegar a darse cuenta de que el poder que aparentemente ha conquistado no es nunca suyo de verdad. Debe tenerse a raya a todas horas, manejando con tiento y con fe todo lo que ha aprendido. Si puede ver que, sin control sobre sí mismo, la claridad y el poder son peores que los errores, llegará a un punto en el que todo se domina. Entonces sabrá cuando y como utilizar su poder”

“Las Enseñanzas de Don Juan”
Carlos Castaneda.

6. Conclusiones

1. El *Fus1* de *K. lactis* codifica para una proteína potencial de membrana que está involucrada en el proceso de apareamiento, probablemente en el evento de la fusión membranal.
2. La transcripción del *Fus1* de *K. lactis* depende de al menos tres elementos involucrados en la respuesta a feromonas de apareamiento: la feromona de la célula del sexo contrario, la subunidad *K/Gpa1* de la proteína G heterotrimérica y el factor transcripcional *K/Ste12*.
3. La distribución y localización de *K/Fus1* depende del estado de desarrollo de la célula durante el proceso de la conjugación sexual en esta levadura.
4. *K/Ste12* es una proteína que forma parte de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento en *K. lactis*.

“Cuando el hombre ha vencido a su tercer enemigo, el poder, estará para entonces, al fin de su travesía por el camino del conocimiento, y casi sin darse cuenta, tropezará con el último de sus enemigos ¡La vejez!. Este enemigo es el más cruel de todos, el único al que no se puede vencer por completo; el enemigo al que solamente podrá ahuyentar por un instante”

“Este es el tiempo en que un hombre ya no tiene miedos, ya no tiene claridad impaciente; un tiempo en que todo su poder está bajo control, pero también el tiempo en el que siente un deseo constante de descansar. Si se rinde por entero a su deseo de acostarse y olvidar, si se arrulla en la fatiga, habrá perdido el último asalto, y su enemigo lo reducirá a una débil criatura vieja. Su deseo de retirarse vencerá toda su claridad, su poder y su conocimiento”

“Pero si el hombre se sacude el cansancio y vive su destino hasta el final, puede entonces ser llamado hombre de conocimiento, aunque sea tan solo por esos momentitos que logra ahuyentar al último enemigo, el enemigo invencible. En esos momentos de claridad, poder y conocimiento son suficientes”

“Las Enseñanzas de Don Juan”
Carlos Castaneda.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Perspectivas

En este trabajo presentamos un modelo de transducción de señales en respuesta a feromonas de apareamiento en la levadura *K. lactis* que integra todos los conocimientos que tenemos a la fecha. Como se puede apreciar, este modelo tiene características en común con dos especies de levadura, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Sin embargo, pensamos que faltan ciertos puntos por definir los elementos que conforman la vía en *K. lactis*:

1. El papel de las subunidades β y γ de la proteína G heterotrimérica en la transducción de la señal.
2. La identidad de las MAPK que conforman la vía.
3. Los genes que se requieren para la conjugación sexual
4. La interrelación de elementos de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento con elementos de otras vías como el remodelamiento del citoesqueleto y/o con la respuesta a catabolismo nitrogenado.

Esperamos que a medida que se vayan describiendo todos estos puntos podamos elaborar un modelo más completo y así contribuir tanto al establecimiento de elementos comunes en los sistemas de transducción que han sido descritos o que se están estudiando, desde levaduras hasta metazoarios superiores, como a la posible interrelación de eventos celulares en *K. lactis*.

8- Bibliografía

- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F., and Pringle, J. R. (1990) *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**: 131-42.
- Alspaugh JA, Perfect JR, Heitman J. (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit Gpa1 and cAMP. *Genes Dev.* Dec 1;11(23):3206-17.
- Alspaugh JA, Perfect JR, Heitman J. (1998) Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol.* Oct;25(1):1-14.
- Amberg DC, Basart E, Botstein D. (1995) Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat Struct Biol.* Jan;2(1):28-35.
- Ammerer G. (1990) Identification, purification, and cloning of a polypeptide (PRTF/GRM) that binds to mating-specific promoter elements in yeast. *Genes Dev.* Feb;4(2):299-312.
- Anderson BL, Boldogh I, Evangelista M, Boone C, Greene LA, Pon LA. (1998) The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J Cell Biol.* Jun 15;141(6):1357-70.
- Astrom SU, Kegel A, Sjostrand JO, Rine J. (2000) *Kluyveromyces lactis* Sir2p regulates cation sensitivity and maintains a specialized chromatin structure at the cryptic alpha-locus. *Genetics.* Sep;156(1):81-91.
- Ayscough K. (1998) Use of latrunculin-A, an actin monomer-binding drug. *Methods Enzymol.* 298:18-25.
- Baba, M., Baba, N., Ohsumi, Y., Kanaya, K., Osumi, M. (1989) Three-dimensional analysis of morphogenesis induced by mating pheromone α factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* **94**:207.
- Barnes, G., Drubin, D.G. Stearns, T. (1990) The cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2**:109.
- Beach DH, Klar AJ. (1984) Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast. *EMBO J.* Mar;3(3):603-10.
- Beck T, Hall MN. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature.* Dec 9;402(6762):689-92.
- Bender, A., and J. R. Pringle. (1989). Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *Cdc42* and three newly identified genes including the ras-related gene *Rsr1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9976-9980.

Bender, A. Sprague, GF. Jr. (1989) Pheromones and pheromone receptors are the primary determinants of mating specificity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. Mar;121(3):463-76.

Bolotin-Fukuhara M, Toffano-Nioche C, Artiguenave F, Duchateau-Nguyen G, Lemaire M, Marmeisse R, Montrouher R, Robert C, Termier M, Wincker P, Wesolowski-Louvel M. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett*. Dec 22;487(1):66-70.

Bourdineaud JP, van der Vaart JM, Donzeau M, de Sampaio G, Verrips CT, Lauquin GJ. (1998) Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. Jan;27(1):85-98.

Brake A, Irvine B, Masiarz F, Shultz K. (1988). Structure of genes encoding precursors of two *Kluyveromyces lactis* transported proteins. *Yeast* 4, S436.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.

Breitkreutz A, Boucher L, Tyers M. (2001) MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Curr Biol*. Aug 21;11(16):1266-71.

Brizzio V, Gammie AE, Rose MD. (1998) Rvs161p interacts with Fus2p to promote cell fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. May 4;141(3):567-84.

Burger G, Strauss J, Scazzocchio C, Lang BF. (1991) nirA, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol Cell Biol*. Nov;11(11):5746-55.

Butty, A. C., Pryciak, P. M., Huang, L. S., Herskowitz, I., and Peter, M. (1998) The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* 282: 1511-1516.

Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* Dec 15;13(24):3271-9.

Chan DC, Bedford MT, Leder P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J*. Mar 1;15(5):1045-54.

Chang EC, Barr M, Wang Y, Jung V, Xu HP, Wigler MH. (1994) Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*. Oct 7;79(1):131-41.

Chen C, Zheng B, Han J, Lin SC. (1997) Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to Galpha proteins and inhibits pheromone signaling in yeast. *J Biol Chem*. Mar 28;272(13):8679-85.

Christ C, Tye BK. (1991) Functional domains of the yeast transcription/replication factor Mcm1. *Genes Dev*. May;5(5):751-63.

Cong F, Tang J, Hwang BJ, Vuong BQ, Chu G, Goff SP. (2002) Interaction between UV-DDB proteins and the c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem*. Jul 9 [en prensa]

Coria, R. (1993) Señales de transducción en levadura. Respuesta a las feromonas de apareamiento. *Mensaje Bioquímico*. Vol XVII 175-207.

Couve A, Hirsch JP. (1996) Loss of sustained Fus3p kinase activity and the G1 arrest response in cells expressing an inappropriate pheromone receptor. *Mol Cell Biol*. Aug;16(8):4478-85.

Crosby JA, Konopka JB, Fields S. (2000) Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Ste12p by mutations at the amino-terminus. *Yeast*. Nov;16(15):1365-75.

Cross FR. (1990) Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *EMBO J*. Mar;9(3):691-6.

Davey J. (1992) Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *EMBO J*. Mar;11(3):951-60.

Davey J. (1998) Fusion of a fission yeast. *Yeast*. Dec;14(16):1529-66.

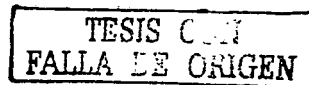
Davis, C. R., Richman, T. J., Deliduka, S. B., Blaisdell, J. O., Collins, C. C., and Johnson, D. I. (1998). Analysis of the Mechanisms of Action of the *Saccharomyces cerevisiae* Dominant Lethal cdc42(G12V) and Dominant Negative cdc42(D118A) Mutations. *J Biol Chem* 273: 849-58.

Dieffenbach, C.W. Dveksler, G.S. (1995) PCR PRIMER. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press. 713 p.

Dolan, J.W. Fields, S. (1990) Overproduction of the yeast STE12 protein leads to constitutive transcriptional induction. *Genes & Development*. 4:492-502.

Dolan, J.W; Kirkman, C; Fields, S. (1989) The yeast Ste12 protein binds to the ADN sequence mediating pheromone induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:5703-5707.

Dorer R, Boone C, Kimbrough T, Kim J, Hartwell LH. (1997) Genetic analysis of default mating behavior in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. May;146(1):39-55.



Dorer R, Pryciak PM, Hartwell LH. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* cells execute a default pathway to select a mate in the absence of pheromone gradients. *J Cell Biol.* Nov;131(4):845-61.

Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol.* Jun 1;10(11):630-9.

Drubin DG. (1991) Development of cell polarity in budding yeast. *Cell.* Jun 28;65(7):1093-6.

Dube P, Konopka JB. (1998) Identification of a polar region in transmembrane domain 6 that regulates the function of the G protein-coupled alpha-factor receptor. *Mol Cell Biol.* Dec;18(12):7205-15.

Duntze, W; Mackay, V; Manney, T.R. (1970) *Saccharomyces cerevisiae* a difussible factor. *Science.* 168:1472-1473.

Duran-Avelar MJ, Ongay-Larios L, Zentella-Dehesa A, Coria R. (2001) 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 Microbiol Lett.* Apr 1;197(1):65-71.

Egel R. (1994) Mapping of additional markers in fission yeast, especially fus1 and three mfm genes. *Curr Genet.* Aug;26(2):187-9.

Elion EA, Trueheart J, Fink GR. (1995) Fus2 localizes near the site of cell fusion and is required for both cell fusion and nuclear alignment during zygote formation. *J Cell Biol.* Sep;130(6):1283-96.

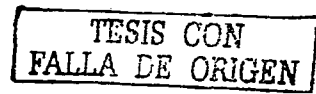
Errede, B; Ammerer, G. (1991) STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-ADN complexes. *Genes-Dev.* Sep; 3(9): 1349-61.

Ferris, P.J., Woessner, J.P., Goodenough, U.W. (1996) A sex recognition glycoprotein is encoded by the *plus* mating-type gene *FUS1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. of the Cell.* 7:1235-1248.

Field, C., Schekman, R. (1980) Localized secretion of acid phosphatase reflects the pattern of cell surface growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 86:123.

Finger, F.P., Novick, P. (1998) Spatial regulation of exocytosis: Lessons from yeast. *J. Cell. Biol.* 3:609-612.

Fukuhara, H; Breunig, K.D; Wésolowski-Louvel, M. (1996) *Kluyveromyces lactis* in Genetics, Biochemistry. and Molecular Biology of Non-Conventional Yeasts. Ed. Springer Verlag. 80 p.



Gammie AE, Brizzio V, Rose MD. (1998) Distinct morphological phenotypes of cell fusion mutants. *Mol Biol Cell*. Jun;9(6):1395-410.

Gancedo JM. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. Jan;25(1):107-23.

Gehring, S., Snyder, M. (1990) The *Spa2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is important for pheromone-induced morphogenesis and efficient mating. *J. Cel. Biol.* **111**:1451.

Gietz RD, Woods RA. (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotech*. Apr;30(4):816-20, 822-6, 828.

Goodenough, U.W., Detmers, P.A., and Hwang,C. (1982) Activation for cell fusion in *Chlamydomonas*:analysis of wild-type gametes and non-fusing mutants. *J. Cell. Biol.* **92**:378-386.

Hagen DC, McCaffrey G, Sprague GF Jr. (1991) Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *Fus1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. Jun;11(6):2952-61.

Hansen, J.E.; O. Lund, J. Engelbrecht, H. Bohr, J.O. Nielsen, J.-E.S. Hansen, and S. Brunak. (1995) Specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Biochem. Jour.*: 308, 801-813.

Hansen J.E.; O. Lund, K. Rapacki and S. Brunak. (1997) O-glycbase version 2.0 - A revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Research*, **25**: 278-282.

Hansen J.E.; O. Lund, N. Tolstrup, A.A. Gooley, K.L. Williams y S. Brunak. (1998) NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconjugate Journal*, **15**: 115-130.

Hasek, J., Rupes, I., Svobodová, J., Streiblová, E. (1997) Tubulin and actin topology during zigote formation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:3355

Heimo H, Palmu K, Suominen I. (1997) Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. *Protein Expr Purif*. Jun;10(1):70-9.

Herskowitz, I. (1988) Lyfe cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. **52**(4). 536-556.

Herman A, Roman H. (1966) Allele specific determinants of homothallism in *Saccharomyces lactis*. *Genetics*. Apr;53(4):727-40.

Herskowitz, I. Oshima, Y. (1981) Control cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: mating type and matying type interconversion. En *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance*. Eds, J.N. Sathern, E.W. Jones y J.R. Broach. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York. pp. 181-210.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hoffman CS, Winston ,F. (1987) A ten-minute ADN preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 1987;57(2-3):267-72.

Hofman-Bang J. (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol*. Aug;12(1):35-73.

Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A. (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nuc. Ac. Res*. Jan 1;27(1):215-9.

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

Jahng KY, Ferguson J, Reed SI. (1988) Mutations in a gene encoding the alpha subunit of a *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signaling. *Mol Cell Biol*. Jun;8(6):2484-93.

Jarvis EE, Clark KL, Sprague GF Jr. (1989) The yeast transcription activator PRTF, a homolog of the mammalian serum response factor, is encoded by the MCM1 gene. *Genes Dev*. Jul;3(7):936-45.

Ji TH, Grossmann M, Ji I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. Jul 10;273(28):17299-302.

Keleher CA, Goutte C, Johnson AD. (1988) The yeast cell-type-specific repressor alpha 2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell*. Jun 17;53(6):927-36.

Keleher CA, Passmore S, Johnson AD. (1989) Yeast repressor alpha 2 binds to its operator cooperatively with yeast protein Mcm1. *Mol Cell Biol*. Nov;9(11):5228-30.

Kempken F, Kuck U. (2000) Tagging of a nitrogen pathway-specific regulator gene in *Tolypocladium inflatum* by the transposon Restless. *Mol Gen Genet*. Mar;263(2):302-8.

Kirkman-Correia, C; Stroke, I,L; Fields, S. (1993) Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol*. Jun; 13(6): 3765-72.

Konopka, JB. Fields S. (1992) The pheromone signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Aug;62(1-2):95-108.

Kronstad , J.W; Holly, J.A; MacKay, V.L. (1987) A yeast operator overlaps an upstream activator site. *Cell*. 50:369-377.

Kubler E, Mosch HU, Rupp S, Lisanti MP. (1997) Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem*. Aug 15;272(33):20321-3.

Kurjan, J. (1990) G proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En *G Proteins*. Eds. R. Iyengar y L Birnbaumer. Academic Press. New York. pp. 571-599.

Kurjan J, Hirsch JP, Dietzel C. (1991) Mutations in the guanine nucleotide-binding domains of a yeast G alpha protein confer a constitutive or uninducible state to the pheromone response pathway. *Genes Dev*. Mar;5(3):475-83.

Kurjan, J. (1992) Pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1097-1129.

Kyte J, Doolittle RF. (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J Mol Biol*. May 5;157(1):105-32.

Leberer E, Dignard D, Harcus D, Whiteway M, Thomas DY. (1994) Molecular characterization of SIG1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in negative regulation of G-protein-mediated signal transduction. *EMBO J*. Jul 1;13(13):3050-64.

Lech, K. y Brent R. (1987) Minipreps of plasmid DNA. En *Current Protocols in Molecular Biology*. F.M Ausbel. R Brent. R.E Kingston. D.D. Moore. J.G. Seidman. J.A. Smith and K. Struhl (Eds) John Wiley and Sons. New York. 264-265.

Lehle L, Bauer F, Tanner W. (1977) The formation of glycosidic bonds in yeast glycoproteins. Intracellular localisation of the reactions. *Arch Microbiol*. Jul 26;114(1):77-81.

Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. Dec;64(4):746-85.

Lipke, P.N. Kurjan, J.(1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev*. Mar;56(1):180-94.

Lloret, A. (2001) Estudios sobre la expresión del gen *FUS1* de *Saccharomyces cerevisiae* en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento de *Kluyveromyces lactis*. IFC,UNAM. 38pp.

Lyons DM, Mahanty SK, Choi KY, Manandhar M, Elion EA. (1996) The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. Aug;16(8):4095-106.

Madden, K. Snyder, M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol*. 52:687-744.

Marcus S, Polverino A, Chang E, Robbins D, Cobb MH, Wigler MH. (1995) Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 20;92(13):6180-4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Marriott M, Tanner W. (1979) Localization of dolichyl phosphate- and pyrophosphate-dependent glycosyl transfer reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* Aug;139(2):566-72.

Marsh, L., Rose, M.D. (1997) The pathway of cell and nuclear fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *En The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Cell cycle and Cell biology.* Cold Sprig Harbour Laboratory. Cold Sprig Harbour Press, NY. 827-888.

Marsh, L. (1991) Signal transduction during pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:699-728.

Mayer BJ. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* Apr;114(Pt 7):1253-63.

Mayer B.J., Hamaguchi M., Hanafusa H. (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature.* Mar 17;332(6161):272-5.

Mayer BJ, Baltimore D. (1994) Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* May;14(5):2883-94.

McCaffrey G, Clay FJ, Kelsay K, Sprague GF Jr. (1987) Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* Aug;7(8):2680-90.

Meluh, P.B., Rose, M.D. (1990) *Kar3*, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell.* 60:1029.

Michaelis S, Herskowitz I. (1988) The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol Cell Biol.* Mar;8(3):1309-18.

Miller AM. (1984) The yeast MATa1 gene contains two introns. *EMBO J* May;3(5):1061-5.

Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory.* Cold Spring Harbour, New York. p. 466.

Miyamoto, S., Ohya, Y., Sano, Y., Sakaguchi, S., Iida, H., and Anraku, Y. (1991) A DBL-homologous region of the yeast *Cls4/Cdc24* gene product is important for Ca(2+)-modulated bud assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 604-10.

Morton CJ, Campbell ID. (1994) SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol.* Jul 1;4(7):615-7.

Mosch HU, Roberts RL, Fink GR. (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 28;93(11):5352-6.

Moskow JJ, Gladfelter AS, Lamson RE, Pryciak PM, Lew DJ. (2000) Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. Oct;20(20):7559-71.

Mussacchio A., Gibson T., Lehto V.P., Saraste M. (1992) SH3--an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett*. Jul 27;307(1):55-61.

Nakafuku M, Obara T, Kaibuchi K, Miyajima I, Miyajima A, Itoh H, Nakamura S, Arai K, Matsumoto K, Kaziro Y. (1988) Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar;85(5):1374-8.

Nakayama N, Kaziro Y, Arai K, Matsumoto K. (1988) Role of STE genes in the mating factor signaling pathway mediated by GPA1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. Sep;8(9):3777-83.

Needleman SB, Wunsch CD. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*. Mar;48(3):443-5.

Neer, J.M. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*. Vol 80. 249-257.

Neiman AM, Stevenson BJ, Xu HP, Sprague GF Jr, Herskowitz I, Wigler M, Marcus S. (1993) Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol Biol Cell*. Jan;4(1):107-20.

Nielsen O, Davey J, Egel R. (1992) The ras1 function of *Schizosaccharomyces pombe* mediates pheromone-induced transcription. *EMBO J*. Apr;11(4):1391-5.

Niccoli, T. Nurse P. (2002) Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast. *J Cell Sci*. Apr 15;115(Pt 8):1651-62.

Nobes C, Hall A. (1994) Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev*. Feb;4(1):77-81.

Noble, M.E. Mussacchio, A. Courtneidge, S.A. Wierenga, R.K. Saraste, M. (1993) Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J*. Jul;12(7):2617-24.

Oehlen, B. Cross, F.R. (1994) Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Cell Biology*. 6:836-841.

Oehlen LJ, Cross FR. (1998) Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. Sep 25;273(39):25089-97.

Oehlen LJ, McKinney JD, Cross FR. (1996) Ste12 and Mcm1 regulate cell cycle-dependent transcription of FAR1. *Mol Cell Biol*. Jun;16(6):2830-7.

Olson KA, Nelson C, Tai G, Hung W, Yong C, Astell C, Sadowski I. (2000) Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-responsive transcription by separate mechanisms. *Mol Cell Biol.* Jun;20(12):4199-209.

Ongay-Larios L, Savinon-Tejeda AL, Williamson MJ Jr, Duran-Avelar M, Coria R. (2000) The Leu-132 of the Ste4(Gbeta) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 alpha factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett.* Feb 4;467(1):22-6.

Park, H.O., Bi, E., Pringle, J.R., Herskowitz, I. (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4463-4468.

Passmore S, Elble R, Tye BK. (1989) A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev.* Jul;3(7):921-35.

Passmore S, Maine GT, Elble R, Christ C, Tye BK. (1988) *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT alpha cells. *J Mol Biol.* Dec 5;204(3):593-606.

Pawson T. (1994) SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv Cancer Res.* 64:87-110.

Pawson T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature.* Feb 16;373(6515):573-80.

^aPetersen J, Nielsen O, Egel R, Hagan IM. (1998) F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* Apr;111 (Pt 7):867-76.

^bPetersen J, Nielsen O, Egel R, Hagan IM. (1998) FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol* Jun 1;141(5):1217-28.

Petersen, J; Weilguny, D; Egel, R; Nielsen, O. (1995) Characterization of *Fus1* of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol. Cell. Biol.* 15:3697-3707.

Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R., Bender, A. (1994) Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho type GTPases in yeast. *J. Cell Biol.* 127:1395-1406.

Poch O, L'Hote H, Dallery V, Debeaux F, Fleer R, Sodoyer R. (1992) Sequence of the *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene.* Sep 1;118(1):55-63.

Poritz MA, Malmstrom S, Kim MK, Rossmeyssl PJ, Kamb A. (2001) Graded mode of transcriptional induction in yeast pheromone signalling revealed by single-cell analysis. *Yeast*. Oct;18(14):1331-8.

Quandt, K. Frech, K. Karas, H. Wingender, E. and Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data *Nuc. Ac. Res.* 23:4878-4884.

Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. (1993). Identification of a 10-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161.

Regenfelder E, Spellig T, Hartmann A, Lauenstein S, Bolker M, Kahmann R. (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* Apr 15;16(8):1934-42.

Reid, B.J., Hartwell, L.H. (1977) Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 75: 355.

Riezman H, Munn A, Geli MI, Hicke L. (1996) Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia*. Dec 15;52(12):1033-41.

Roberts, RL. Fink, GR. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* Dec 15;8(24):2974-85.

Rodaway AR, Sternberg MJ, Bentley DL. (1989) Similarity in membrane proteins. *Nature*. Dec 7;342(6250):624.

Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Zik M, Fromm H, Gruissem W. (1999) The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J.* Apr 1;18(7):1996-2007.

Rose, MD. (1996) Nuclear fusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:663-95.

Sambrook J. Fritsch, E.T y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Cold Spring Harbor. N.Y. 4.37-4.38.

Saviñón-Tejeda AL, Ongay-Larios L, Ramirez J, Coria R. (1996) Isolation of a gene encoding a G protein alpha subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. Sep 15;12(11):1125-33.

Saviñón-Tejeda AL, Ongay-Larios L, Valdes-Rodriguez J, Coria R. (2001) The *K/Gpa1* gene encodes a G-protein alpha subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol.* Jan;183(1):229-34.

Schmitt MJ, Pfeiffer PC. (1990) Immunochemical analysis of the carbohydrate moiety of yeast killer toxin K28. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Nov;58(4):277-82.

Segal, JE. (1993) Polarization of yeast cells in spatial gradients of alpha mating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;90(18):8332-6.

Sengupta P, Cochran BH. (1990) The PRE and PQ box are functionally distinct yeast pheromone response elements. *Mol Cell Biol*. Dec;10(12):6809-12.

Schrick, K; Garvik, B y Hartwell, LH. (1997) Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics*. 147(1): 19-32.

Shore D, Squire M, Nasmyth KA. (1984) Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J*. Dec 1;3(12):2817-23.

Simon MN, De Virgilio C, Souza B, Pringle JR, Abo A, Reed SI. (1995) Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature*. Aug 24;376(6542):702-5.

Sloat, B.F., Adams, A., Pringle, J.R. (1981). Roles of the *CDC24* gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell. Biol.* **89**:395.

Snyder, M., Gehrung, S., Page, B.D. (1991) Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **114**:515.

Song, D; Dolan, J.W; Yuan, Y.L; Fields, S. (1991) Pheromone-dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation. *Genes Dev*. May; 5(5): 741-50

Souciet J, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, de Montigny J, Dujon B, Durrens P, Gaillardin C, Lepingle A, Llorente B, Malpertuy A, Neuvéglise C, Ozier-Kalogeropoulos O, Potier S, Saurin W, Tekaia F, Toffano-Nioche C, Wesolowski-Louvel M, Wincker P, Weissenbach J. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett*. Dec 22;487(1):3-12.

Soussi-Boudekou S, Andre B.A. (1999) A co-activator of nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. Feb;31(3):753-62.

Spain BH, Koo D, Ramakrishnan M, Dzudzor B, Colicelli J. (1995) Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein alpha subunit deficiency by interacting with the beta subunit. *J Biol Chem*. Oct 27;270(43):25435-44.

Sprague, GF. Blair, LC. Throner, J. (1983) Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol*. 37:623-60.

Sprague, G.F Jr., Thorner, J.W. (1992) Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. En *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene expression.*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Vol II.

Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* Jun;9(9):745-54.

Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M. (1991) *Schizosaccharomyces pombe* ste11+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev.* Nov;5(11):1990-9.

Tan S, Ammerer G, Richmond TJ. (1988) Interactions of purified transcription factors: binding of yeast MAT alpha 1 and PRTF to cell type-specific, upstream activating sequences. *EMBO J.* Dec 20;7(13):4255-64.

Thorner, J. (1980) Intercellular interactions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En *The molecular genetics of development* (ed, T.J. Leighton *et al*), p. 119. Academic Press, New York.

Trueheart J, Boeke JD, Fink GR. (1987) Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol.* Jul;7(7):2316-28.

Trueheart J, Fink GR. (1989) The yeast cell fusion protein *Fus1* is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;86(24):9916-20.

Tu H, Barr M, Dong DL, Wigler M. (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol.* Oct;17(10):5876-87.
Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, Ninomiya C, doAmaral C, Peters H, Habal M, Rhee-Morris L, Doss JB, Kreiborg S, Olsen BR, Reichenberger E. (2001) Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet.* Jun;28(2):125-6.

Valenzuela, L. Aranda, C. González, A. (2001) TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol.* Apr;183(7):2331-4.

Valtz N, Peter M. (1997) Functional analysis of FAR1 in yeast. *Methods Enzymol.* 283:350-65.

van Drogen F, Stucke VM, Jorritsma G, Peter M. (2001) MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol.* Dec;3(12):1051-9.

Van Hoof C, Janssens V, De Baere I, de Winde JH, Winderickx J, Dumortier F, Thevelein Van Rinsum J, Klis FM, van den Ende H. (1991) Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9. *Yeast.* Oct;7(7):717-26.

Wach, A. Brachat, A. Pohlmann, R. Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Dec;10(13):1793-808.

White, J.M. (1992) Membrane fusion. *Science*. **258**:917-924.

Whiteway MS, Wu C, Leeuw T, Clark K, Fourest-Lieuvain A, Thomas DY, Leberer E. (1995) Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science*. Sep 15;269(5230):1572-5.

Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D.F., and Appel, R.D. (1997) Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis* 18(3-4), 403-408.

Yamawaky-Kataoka, Y., Tamaoki, H.-R. Choe, Tanaka H. and Kataoka, T. (1989) Adenilate cyclases in yeast; a comparison of the genes form *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 86:7989-7993.

Yuan, Y.O.; Stroke, I.L.; Fields, S. (1993) Coupling of cell identity to signal response in yeast: Interaction between the alpha 1 and STE12 proteins. *Genes-Dev.* 7(8): 1584-97.

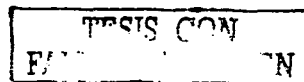
Yuan GF, Marzluf GA. (1992) Molecular characterization of mutations of nit-4, the pathway-specific regulatory gene which controls nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* Jan;6(1):67-73.

Yue C, Cavallo LM, Alspaugh JA, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. (1999) The STE12alpha homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*. Dec;153(4):1601-15.

Zhao ZS, Leung T, Manser E, Lim L. (1995) Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol Cell Biol.* Oct;15(10):5246-57.

Zheng, Y., Cerione, R., Bender, A. (1994) Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* **269**:2369-2372.

Publicación del trabajo en la revista *FEMS Microbiology Letters*.





1 The *KIFUS1* gene is required for proper haploid mating and its
 2 expression is enhanced by the active form of the G α (Gpa1) subunit
 3 involved in the pheromone response pathway of the yeast
 4 *Kluyveromyces lactis*

5 Alejandro Lloret, Alma Saviñón-Tejeda, Laura Ongay-Larios, Eda P. Tenorio,
 6 Roberto Coria *

7 Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México,
 8 D.F., Mexico

9 Received 18 October 2002; received in revised form 13 December 2002; accepted 16 December 2002

10 First published online

11 **Abstract**

12 The *Kluyveromyces lactis FUS1* gene was cloned, physically characterized and its role in the mating response pathway was determined.
 13 The gene encodes a putative membrane protein, whose structure shows a single membrane-spanning segment, a short extracellular amino-
 14 terminus and a long carboxy-terminus, located in the cytoplasmic side. The predicted primary structure of the protein shows a number of
 15 serine and threonine residues in the amino-terminus, which in analogy to Fus1p of *Saccharomyces cerevisiae* might be O-glycosylated. A
 16 fus1-GFP hybrid protein was tentatively located in the plasma membrane of dividing cells and upon activation of the pheromone response
 17 pathway, the protein seems to be relocated at the tip of elongated cells. KIFus1p is required for optimal conjugation of sexual partners
 18 and its expression is significantly enhanced by overexpression of both a constitutively active form of KIGpa1p, the G protein α subunit
 19 that triggers the mating response in this strain, and the KISte12p transcription factor. Inactivation of the KISte12 protein strongly reduces
 20 mating and affects *KIFUS1* gene expression. The *KIFUS1* gene has been deposited in the GenBank under accession number AF519444.
 21 © 2003 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

22 **Keywords:** Fus1; G protein; Signal transduction; Mating; *Kluyveromyces lactis*

25 **1. Introduction**

26 Sexual conjugation of haploid cells of the budding yeast
 27 *Saccharomyces cerevisiae* requires the activation of the
 28 mating pheromone response pathway, one of the best
 29 characterized eukaryotic mitogen-activated protein
 30 (MAP) kinase pathways [1]. A haploid cell starts the mating
 31 process when a sexual pheromone, produced by the
 32 mating partner, binds to its specific membrane-spanning
 33 receptor. The pheromone stimulus is transmitted via a
 34 heterotrimeric G protein composed of G α (Gpa1p), G β
 35 (Ste4p) and G γ (Ste18p) subunits, coupled to the phero-
 36 mone receptor [2,3]. The Gpa1p subunit negatively regu-

37 lates the response in the absence of pheromone and the
 38 Ste4p/Ste18p dimer acts positively to trigger the response
 39 after binding of pheromone, via a phosphorylation cas-
 40 cade that involves at least Ste20p, the MAP kinase module
 41 and transcription activators that finally induce growth ar-
 42 rest, shmoo formation, induction of genes required for
 43 membrane fusion, including *FUS1*, and diploid formation
 44 [4].

45 In this pathway the Ste12p transcription factor plays a
 46 critical role in expression of genes required for mating.
 47 Ste12p binds to the pheromone response element (PRE),
 48 a sequence located in promoter regions of haploid-specific
 49 genes [5-7]. Overproduction of Ste12p leads to increased
 50 transcription of the cell type-specific genes and to suppres-
 51 sion of the mating defect of upstream *ste* mutants [8].

52 Transcription of haploid-specific genes involved in mat-
 53 ing requires phosphorylation-dependent activation of
 54 Ste12p [9] and binding of the Mcm1 transcription factor

1 * Corresponding author. Tel.: +52 (5) 622 56 52; Fax: +52 (5) 622 56

3 30. E-mail address: reoria@iisiiq.unam.mx (R. Coria).

55 [10]. In *Mata* cells, Mem1p and Ste12p are necessary for
56 the transcription of α -specific genes, with Ste12p binding to
57 PRE sequences and acting as the target of the activity of
58 the pheromone response pathway. In α cells, Mem1p and
59 Ste12p are also necessary for the transcription of α -specific
60 genes, but Ste12p is held in the complex by interaction
61 with the $\alpha 1$ protein. In this case, Ste12 is also the element
62 responding to the pheromone pathway [11].

63 As a result of stimulation with sexual pheromones, ac-
64 tivation of the Ste12 transcription complex triggers direc-
65 tional cell growth in cells of both mating types, resulting in
66 the development of a mating projection directed towards
67 the mating partner [12,13]. After contact of mating part-
68 ners, remodeling of the cell wall and fusion of the plasma
69 membranes to form a single zygote follow [14]. A number
70 of gene products are required for cell fusion during yeast
71 mating, of which *Fus1p*, *Fus2p* and *Fus3p* have been exten-
72 sively studied. Mutations in the genes encoding these
73 proteins result in cell fusion-defective zygotes [15-17]. Par-
74 ticularly, basal transcription of *FUS1* in the absence of
75 pheromone is strongly enhanced when cells are exposed to
76 mating pheromone [18,19], and this transcription is de-
77 pendent on the pheromone-promoted phosphorylated state
78 of the Ste12 factor [9].

79 *Kluyveromyces lactis* is a heterothallic budding yeast
80 closely related to *S. cerevisiae*. We hypothesize that a *S.*
81 *cerevisiae*-like pheromone response pathway is conserved
82 in *K. lactis*. We have cloned and characterized a $G\alpha$ sub-
83 unit (*Gpa1p*) involved in the mating pathway in this
84 strain. In contrast to the role of *Gpa1p* in the mating
85 pathway of *S. cerevisiae*, the $G\alpha$ subunit in *K. lactis*
86 is required for haploid sexual conjugation and its inactiva-
87 tion produces partially sterile cells [20]; moreover, a con-
88 stitutively active allele of $G\alpha$ induces growth arrest and
89 restores mating of *Klappa1* mutant cells. Additionally a
90 gene encoding a protein highly homologous to the α mat-
91 ing factor of *S. cerevisiae* has been identified [21]. This
92 sexual pheromone is thought to activate a pathway that
93 finally turns up the transcription factor *KiSte12p* [11].
94 This factor is thought to bind to PREs located in pro-
95 moter regions of genes required for mating. The *K. lactis*
96 genome has been partially characterized by random se-
97 quencing [22]. From the database generated by this se-
98 quencing project a portion of the gene encoding the or-
99 tholog of the *SeFus1* protein was identified. Here we
100 describe the cloning of the full *KIFUS1* gene and the par-
101 ticipation of its product in the pheromone response path-
102 way of *K. lactis* cells.

103 2. Materials and methods

104 2.1. Strains, plasmids and media

105 Yeast strains used in this work are described in Table 1.
106 *Escherichia coli* strain DH α 5 was used to propagate plas-

Table 1
Yeast strains used in this work

| Strain | Genotype | |
|----------------------|---|----|
| <i>K. lactis</i> | | 1 |
| WM37 (NRRL Y-1140) | <i>Mata, his3</i> | 2 |
| 12/8* | <i>Mata, org4, lysA, ura4</i> | 3 |
| 155* | <i>Mata, ade2, his3, ura4</i> | 4 |
| CXJ1-7A* | <i>Mata, ade1, ura4, leu2</i> | 5 |
| CXJ2* | <i>Mata, org4, his3, ura4, fus1</i> | 6 |
| 12/8-F1* | <i>Mata, ade2, his3, ura4, fus1::Kan^R</i> | 7 |
| 155-F1* | <i>Mata, org4, lysA, ura4, ste12::URA3</i> | 8 |
| 12/8-S12* | <i>Mata, ade2, his3, ura4, ste12::URA3</i> | 9 |
| 155-S12* | | 10 |
| <i>S. cerevisiae</i> | | 11 |
| W303-1A* | <i>Mata, ade2-1, his3, leu2, trp1, ura3, can1-100</i> | 12 |
| W303-1F* | <i>Mata, ade2-1, his3, leu2, trp1, ura3, can1-100, fus1::LEU2</i> | 13 |
| C2 ^d | <i>Mata, leu2, lys2</i> | 14 |
| C2016 ^e | <i>Mata, leu2, lys2, fus1::LEU2</i> | 15 |

*Obtained from H. Fukuhara.

^bDescribed in Savinón-Tejeda et al. [20].

^cSegregant of the cross between WM37 and CXJ1-7A.

^dObtained from A. González.

^eThis work.

107 mids. pBluescript (pBS) phagemid was used to subclone
108 DNA fragments for sequencing. YEpKD and YEpKDHs
109 have been described [20]. The YIp352 vector [23] was used
110 for gene disruption. YPD medium consisted of 1% yeast
111 extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose. 5 μ g ml⁻¹ of
112 geneticin was added to YPD for resistant plasmid selec-
113 tion. SD minimal medium consisted of 0.67% yeast nitro-
114 gen base without amino acids (Difco) and 2% glucose.
115 Required nitrogen bases and amino acids were added at
116 a final concentration of 25 μ g ml⁻¹. LB plus ampicillin 100
117 μ g ml⁻¹ was used to propagate recombinant plasmids.

118 2.2. Identification and cloning of the *KIFUS1* gene

119 Oligodeoxynucleotides were designed from positions 79
120 (forward) and 816 (reverse) of the *FUS1* homologous se-
121 quence (EMBL accession number AL427517) reported by
122 the random sequencing project [22] and used for polymer-
123 ase chain reaction (PCR) amplification from the chromo-
124 somal DNA of *K. lactis* strain WM37. The PCR product
125 was then used to probe chromosomal DNA digested with
126 several restriction enzymes. DNA *Hind*III fragments in the
127 range of 4 kb, which cross-reacted with the probe, were
128 used to construct a pBS-based library of 200 clones.
129 Screening of the library was done using the same probe.
130 Selected clones were analyzed with restriction enzymes and
131 sequenced in full in both directions.

132 2.3. Gene disruptions

133 The 4.1-kb fragment of the *KIFUS1* gene was subcloned
134 into YEp352 digested with *Hind*III. The resulting plasmid
135 was opened with *Asp*718. Klenow filled and digested with

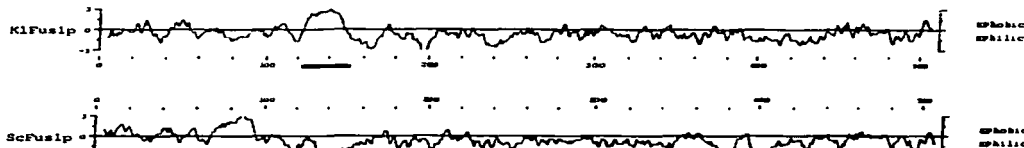
| | | |
|-----|--|---|
| 136 | <i>Sma</i> I. The <i>Eco</i> RI (Klenow filled)- <i>Sma</i> I fragment containing the geneticin cassette [24] was inserted and used for transformation of <i>K. lactis</i> strains 155 and 12/8. The <i>ScFUS1</i> gene was amplified by PCR, using oligodeoxynucleotides (22-mer) designed from positions 197 (forward) and 899 (reverse) and subcloned into YIp352. The resulted plasmid was opened into the native <i>Sph</i> I restriction site for gene disruption. The <i>ScSTE12</i> gene containing its promoter region was cloned by PCR-mediated amplification using the oligodeoxynucleotides designed from positions -387 (forward) and 2230 (reverse). This PCR product contains the full open reading frame (ORF) and 386 bp of the promoter region. The PCR product was subcloned into vector YEpKD. A 1.3-kb <i>Eco</i> RI fragment from position -369 to 959 was subcloned into YIp352, opened with <i>Bgl</i> II and used for gene disruption. Gene disruptions were confirmed by Southern blotting. | 186 |
| 137 | | |
| 138 | | |
| 139 | | |
| 140 | | |
| 141 | | |
| 142 | | |
| 143 | | |
| 144 | | |
| 145 | | |
| 146 | | |
| 147 | | |
| 148 | | |
| 149 | | |
| 150 | | |
| 151 | | |
| 152 | | |
| 153 | 2.4. Construction of KIGpa1^{Q298L} | |
| 154 | The <i>KIGpa1</i> gene [20] was subjected to PCR-mediated mutagenesis. A 25-mer reverse primer was designed from position +881. This oligodeoxynucleotide carries the substitution of A (+893) to T that produces a change of glutamine 298 to leucine in the <i>KIGpa1</i> protein. PCR was done employing the mutagenic reverse oligodeoxynucleotide and a forward 16-mer primer designed from position +297. The PCR product (608 bp) was digested with <i>Hind</i> III and a 241-bp fragment carrying the mutated position was used as a forward primer in a second PCR reaction along with the reverse 16-mer primer designed from position 1408. The resulting product was digested into the naturally occurring <i>Xho</i> I and <i>Clal</i> sites and a 248-bp fragment containing the indicated substitution was subcloned into YEpKDGpa1 [20] digested with the same enzymes to give rise to YEpKDGpa1*. | |
| 155 | | |
| 156 | | |
| 157 | | |
| 158 | | |
| 159 | | |
| 160 | | |
| 161 | | |
| 162 | | |
| 163 | | |
| 164 | | |
| 165 | | |
| 166 | | |
| 167 | | |
| 168 | | |
| 169 | | |
| 170 | 2.5. Construction of hybrid proteins | |
| 171 | A 1138-bp fragment of the <i>KIFUS1</i> gene containing 874 bp of the untranslated 5' region and 264 bp of the coding region, obtained with <i>Hind</i> III and <i>Xba</i> I restriction enzymes, was ligated into the YEpKD-LACZ vector [25] previously digested with the same restriction enzymes. This gave rise to plasmid pKIFus1-LacZ. This construction places 88 amino acids of the KIFus1 protein in frame with the full β -galactosidase protein and under the control of the <i>KIFUS1</i> promoter. KIFus1-GFP fusion was done by ligating the 2838-bp <i>KIFUS1</i> gene that contains the full ORF and its promoter region, with the <i>Eco</i> RI- <i>Not</i> I 750-bp fragment containing 250 amino acid residues of the green fluorescent protein (GFP). This places the full ORF of <i>KIFUS1</i> fused in frame with GFP under the control of the <i>KIFUS1</i> promoter (pKIFus1-GFP). | |
| 172 | | |
| 173 | | |
| 174 | | |
| 175 | | |
| 176 | | |
| 177 | | |
| 178 | | |
| 179 | | |
| 180 | | |
| 181 | | |
| 182 | | |
| 183 | | |
| 184 | | |
| 185 | | |
| | 2.6. Assays of pheromone response | |
| | <i>K. lactis</i> strains of both mating types were grown for 72 h at 30°C until saturation in liquid YPD medium. Cultures were centrifuged at 5 K for 10 min. Supernatant was filtered through a 45-nm pore size filter. The resulting filtered solution was used for pheromone induction assays in a 3:1 ratio. Activity of pheromone was determined by monitoring its effect on cell growth. | 187 188 189 190 191 192 193 |
| | 2.7. Mating assays | 194 |
| | A patch of cells of the strain to be tested was grown on a plate of selective medium for 24 h. The tester strain was grown as a lawn on a YPD plate for 24 h. Both strains were replica plated onto YPD plate and incubated overnight at 30°C to allow cells to mate. When indicated, matings were done by incubating overnight at 14°C. Diploids were selected on SD medium by replica plating. For quantitative mating assays, strains to be tested were grown until mid-exponential phase in YPD or selective medium for plasmids. 1×10^6 cells were then mixed with an equal number of cells of the tester strain, in 100 μ l of YPD and incubated overnight at 30°C. The cells were collected by centrifugation, diluted and plated on SD medium. | 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 |
| | 2.8. Other | 208 |
| | Molecular biology procedures were performed as described [26]. Standard yeast genetics procedures were done as described by Sherman et al. [27]. Assays for β -galactosidase determination were done as described [25]. Fluorescence emitted by GFP was registered by confocal microscopy using Bio-Rad 1024 equipment. | 209 210 211 212 213 214 |
| | 3. Results | 215 |
| | 3.1. The KIFUS1 gene encodes a putative membrane-spanning protein | 216 217 |
| | Random sequencing of the <i>K. lactis</i> genome [22] allowed the identification of a fragment with homology to the <i>Fus1</i> gene from <i>S. cerevisiae</i> . The sequence deposited at EMBL database under accession number AL427517 showed 55% similarity with the 3' end (from position 1275 to position 1538) of the <i>S. cerevisiae FUS1</i> ORF. We designed oligodeoxynucleotides from the reported sequences to amplify this fragment by PCR from the <i>K. lactis</i> genome (strain WM37). The obtained PCR product was sequenced in full to confirm identity and then used to probe the <i>K. lactis</i> genome looking for the full gene. A pBS-based library was prepared from <i>Hind</i> III chromosomal DNA fragments in the range of 4 kb that cross-reacted with the labeled probe. Colony screening was done on the mini-library. Two positive clones were identified from 200 and found | 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 |

A

```

KIFus1p MEIETETRTVIOTMNNELILHNEATVINTIYVDOOYRASNTLPYALTTVSTAFATQLNKNVKTATITNQVTTTIETSQESSTSTSSSHSS (90)
ScFus1p          KVAITMQTTTTLVTTVAAMSTTLASNYISSQASSSTVTTVT (43)
KIFus1p SSLGVOSSQARMTSGISLNSLASTSDGKNTSGTINGLAIGLPIALFVVGGLGVFGLFYRFRHSKVD. . . PDNENMQOHEP. . . DSVLGG (174)
ScFus1p IATSIRSTPSNLLFSNVA. . . . . AOPKSSASTGSLSIGLPIGIFCFGLLILLCYFYLLKRNVSISINPSPSATIPREEEYCRRTNWF (126)
KIFus1p KLYGQOELNDLKK . AELFNEKKEQEKYDSC . . . VSSKITVYVKRPIYSHPELLIOTPEKLAFTDNFYR. KNVWQKSDTHAV. SNSTHDLQGF (216)
ScFus1p RLFWQSKCEDQMSYNRDIEKQDWTOMTSGDNMSSKIQYKISKPII. . . POHILTPKKTVMKNPYAKSKNISLDPKVNEMEEKVVDAFLY (264)
KIFus1p PRP . . . . . LASPFKKWNYEPLSRWFLTKSTLIQD. . . KIQTAKTPT. . . IHLKQLNILARANKSKITI (317)
ScFus1p TKFPNIVHIESMPSYNDLPSQKTVSSKKTALKTSEKWSYEPSLSRWFLRGSTYFKDYGLSKTSLKPTGAPOLKQHMLSRIKSGYFNE (304)
KIFus1p NGEPEPYTEMSPLP. . . SVPRSPYEAIESL. . . . . PSLELKEESITPINESKIRTEQ. . . . . GVTKPQIITDNLKPTIYPTLLKDLKSKTKPLP (398)
ScFus1p SDIMP. DERSPILEYNNTPLDANDS VNNLGNLTPDSQITSYRNNNIDILITARPHSVIYGTTAQOOLETFNFDHDKCKSTEKHELLIPTP (392)
KIFus1p KFPNPHFTSANDD. . . OHVSDNVSARS DHDHLRSARKSTAQEQ. AKLYRVVQKOYAVLMDDEIDIRGGLVLRVLRARHTDGCWGLVRSNIQN (484)
ScFus1p SKPLKRRKKRRQSKYQIHLQHLRSRKLPLTPNSKYNGEASVQLGKTYTVIODEYEPRLTDEIRSLGKVKYKILATHDGCWGLVCKNTQK (483)
KIFus1p . . . HSSLGDGTYLNNRNGIVPGLCLQESH (510)
ScFus1p GSIHVSDDKRYLNDRGRIVPGDCLQEYD (512)
    
```

B



1 Fig. 1. A: Alignment of amino acid sequences of Fus1 proteins from *K. lactis* (top) and *S. cerevisiae* (bottom). Identical amino acids are indicated by
2 asterisks. The predicted transmembrane segment is boxed. B: Secondary structure prediction of Fus1 proteins from *K. lactis* (top) and *S. cerevisiae* (bot-
3 tom). Hydrophobicity was generated according to the Kyte-Doolittle algorithm [30], using the Wisconsin Sequence Analysis Package of the Genetics
4 Computer Group. Black bars indicate the predicted transmembrane segment.

233 to be identical by restriction analysis. One of them was
234 sequenced in both directions. The full ORF spans 1533
235 nucleotides including the stop codon and encodes a pre-
236 dicted product of 510 amino acid residues with an esti-
237 mated molecular mass of 57 kDa. The sequence has
238 been deposited in the GenBank under accession number
239 AF519444. The deduced KIFus1 protein shows overall
240 33% identity and 40% similarity with Fus1p from *S. cere-*
241 *visiae* (Fig. 1A). Maximum homology (63% identity) was
242 found in the last 60 amino acid residues of the carboxy
243 end (Fig. 1A) where a putative Src homology 3 (SH3)
244 domain has been described in ScFus1p [28], and in
245 Fus1p of *Schizosaccharomyces pombe*, a protein required
246 for cell conjugation of *P* and *M* cell types [29]. Even
247 though the overall sequence homology is low, analysis of
248 the secondary structure of the protein using the Kyte-
249 Doolittle algorithm [30] showed high similarities between
250 the putative KIFus1p and the Fus1p from *S. cerevisiae*
251 (Fig. 1B). The secondary structure of KIFus1p strongly
252 resembles ScFus1p, which has been shown to contain a
253 single transmembrane segment connecting the amino-ter-
254 minus with a long cytoplasmic projection [31]. Indeed,
255 KIFus1p contains a domain of 22 amino acid residues

capable of nucleating an α -helix and whose hydrophobic- 256
257 ity value predicts that this region might form a transmem- 257
258 brane segment (Fig. 1). The Fus1p from *S. cerevisiae* is O- 258
259 glycosylated in a cluster of serines and threonines located 259
260 at the amino-terminus, which faces the periplasm [31]. 260
261 KIFus1p, like ScFus1p, contains a number of serine and 261
262 threonine residues in the amino-terminus (Fig. 1), suggest- 262

Table 2
Mating efficiencies of *Kifus1* mutants

| Cross | Mating efficiency ^a | |
|--|--------------------------------|-------------|
| | 30°C | 14°C |
| <i>KIFUS1</i> (155) × <i>KIFUS1</i> (12/8) | 1.0 ± 0.02 | 1.0 ± 0.01 |
| <i>KIFUS1</i> (155) × <i>Kifus1Δ</i> (12/8-F1) | 0.81 ± 0.02 | 0.81 ± 0.03 |
| <i>Kifus1Δ</i> (155-F1) × <i>Kifus1Δ</i> (12/8-F1) | 0.15 ± 0.07 | 0.20 ± 0.02 |

Strains to be tested were grown until mid-exponential phase in SD plus the required amino acids. 1×10^8 cells of both mating pairs were then mixed and incubated overnight at the indicated temperatures. Cells were washed twice, suspended in water and plated on SD medium.

^aNumbers are relative to the mating efficiency of 155 (*Mata, ude2, his3, ura1*) mated to 12/8 (*Mata, uraA, hisA, ura1*). Numbers correspond to the average of three independent experiments.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

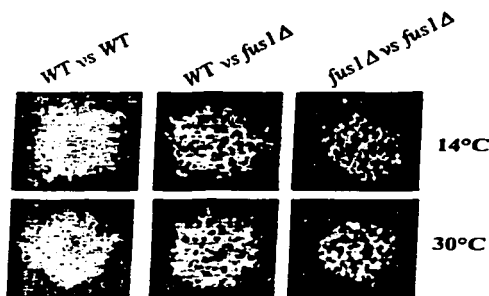


Fig. 2. Effect of *KIFUS1* disruption on mating carried out at different temperatures. Strains to be tested were grown on YPD plates for 24 h and then replica plated to a YPD plate containing a lawn of the indicated partner of the opposite mating type. Mating was carried out overnight at the indicated temperatures. Diploids were selected on SD by replica plate. Wild-type (WT) strains, 12/8 (*Mat α*) and 155 (*Mat α*); *fus1* Δ strains, 12/8-F1 (*Mat α*) and 155-F1 (*Mat α*).

ing that oligosaccharides could also be post-translationally attached to this portion of the protein.

3.2. The *KIFUS1* gene is required for proper mating

Disruption of the *S. cerevisiae* *FUS1* gene leads to reduced mating capacity of mating partners [17,32]. This deficiency is evident if mating is carried out between *fus1* mutants of opposite mating type and at low temperature [33]. Disruption of *KIFUS1* was done in cells of both mating types (Table 1) and confirmed by Southern blot analysis. The mating capacity of the couples *Mat α* , *FUS1* \times *Mat α* , *fus1* and *Mat α* , *fus1* \times *Mat α* , *fus1* is indicated in Table 2 and Fig. 2. As can be observed, disruption of *KIFUS1* in one mating partner has a significant effect on its mating capacity and this deficiency is even more severe in crosses of two *Kifus1* mutant partners. Reduction of mating is obtained by inactivation of *KIFUS1* not only at low temperature but also when mating is carried out at 30°C. In *S. cerevisiae*, on the other hand, mating of *fus1*

couples is observed to be deficient at 14°C while it is practically unaffected at 30°C [33]. In addition, we also analyzed the effect of expression of *KIFUS1* in a *fus1* Δ *S. cerevisiae* strain. *KIFUS1* is able to partially restore mating of the mutant strain at 14°C (not shown), which indicates that *Fus1* proteins play similar roles in both yeast species. Analogous to the role that ScFus1p has on diploid formation, these results strongly suggest that inactivation of *KIFUS1* affects membrane fusion during conjugation of haploid cells.

3.3. Expression of the *KIFUS1* gene is induced by sex pheromone

A gene encoding a protein homologous to the α mating pheromone has been described in the yeast *K. lactis* [21]; however, to date, no commercial version is available. Here we developed conditions to assay pheromone activity in *K. lactis* extracellular culture media. We were able to induce growth arrest on haploid yeast cultures using a saturated cell-free medium (see Section 2). We found that an exponentially growing culture of *Mat α* cells stops dividing when it is exposed to cell-free medium in which a *Mat α* strain has been grown for 72 h at 30°C (not shown). These cultures showed a high percentage of unbudding cells compared to untreated cultures (60% vs. 30%). We then investigated if the α pheromone contained in the culture medium induces *KIFUS1* expression. For this purpose we used the fusion of the *FUS1* promoter from *K. lactis* with the *LACZ* gene from *E. coli* as a reporter for gene expression. This fusion carries 874 bp of the 5' untranslated region of *KIFUS1* and 264 bp of its ORF encoding 88 amino acid residues of the *KIFUS1* amino-terminus, followed in frame by the full *LACZ* gene. The β -galactosidase assay was done in a *lact* strain, in order to avoid background from the native β -galactosidase of *K. lactis* strains [34]. Table 3 shows specific β -galactosidase activity determined upon stimulus of α pheromone in a *Mat α* strain carrying a multicopy plasmid with the fusion protein. As can be observed, pheromone-stimulated cells show 10-fold induction of β -galactosidase activity compared to non-stimulated cells. β -Galactosidase activity is hardly observed in pheromone-stimulated cells carrying vector alone. This indicates that α pheromone is able to increase

Table 3
KIFUS1 induction on cells carrying the *KIFUS1-LACZ* fusion

| Strain | β -Galactosidase activity (U mg protein ⁻¹ h ⁻¹) | | |
|----------------------|---|--------------------|-----------------------------------|
| | - | α pheromone | [YE β KDGpa1 [*]] |
| CLN2 [pKIFUS1-LacZ] | 251 \pm 28 | 2694 \pm 137 | 3944 \pm 165 |
| CLN2 [YE β KD] | 54 \pm 17 | 34 \pm 15 | 43 \pm 10 |

Strains harboring the indicated plasmids were grown at 30°C until mid-exponential phase. Cells were washed twice and suspended in SD plus the required amino acids. Incubation was continued for 6 h. 50 \times 10⁶ cells were then collected, washed twice and assayed for β -galactosidase. α pheromone corresponds to cell-free medium from a saturated culture of strain 155.

*Numbers represent the average of three independent experiments.

^{*}Constitutively active Gpa1 subunit (KIGpa1)^{DS Δ L}.

281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322

TESIS CON
FALLA 11
GEN

323 *FUS1* transcription in *Mata* cells, and that this transcrip-
324 tion is reflected in the total amount of β -galactosidase
325 produced. *Mata* cells treated with saturated medium
326 from *Mata* cells showed no induction of *KIFUS1*.

327 3.4. A constitutively active allele of α subunit increases 328 transcription of the *FUS1* gene

329 Unlike in *S. cerevisiae* where the G protein α subunit
330 negatively regulates mating response, in *K. lactis* the α
331 protein is required for mating and mutants lacking the α
332 subunit are partially sterile [20]. The constitutively active
333 allele of α G α^{Q298L} defective in GTPase activity causes slow
334 growth of normal haploid *S. cerevisiae* cells [35] indicating
335 constitutive activation of the pheromone response path-
336 way, most probably by inefficient association with the
337 G $\beta\gamma$ dimer. We constructed an equivalent α allele in
338 *K. lactis* (Gpa1^{Q298L}) and determined its role in the mating
339 pathway. KIGpa1^{Q298L} has no effect on mating of wild-
340 type cells, but restores mating deficiency of *gpa1Δ* cells
341 (not shown), in a similar fashion as done by the
342 KIGpa1^{N364K} allele described before [20]. When
343 KIGpa1^{Q298L} is co-expressed with plasmid carrying the
344 *FUS1-LACZ* fusion (Table 3), expression of *KIFUS1* in-
345 creases 1.5 times, compared to cells treated with α phero-
346 mone, and 15 times compared to non-stimulated cells.
347 This last observation indicates that the *KIFUS1* gene is a
348 target of the signal transduction pathway activated by the
349 α subunit of the *K. lactis* heterotrimeric G protein. Addi-
350 tion of α pheromone to cells expressing KIGpa1^{Q298L}
351 had no significant effect on further *KIFUS1* expression
352 (not shown), suggesting that constitutively active α sub-
353 unit fully activates the mating pathway of *K. lactis*.

354 3.5. *KISte12* transcription factor is essential for both 355 mating and *FUS1* expression

356 We then investigated if the *KISte12* transcription factor
357 is required for expression of the *KIFUS1* gene and whether
358 this pathway is activated in cells competent for mating.
359 *KISte12p* was previously cloned and expressed in sterile

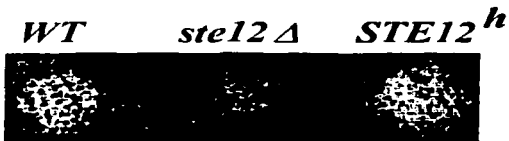
S. cerevisiae cells lacking their native *Ste12* protein, and
360 shown to restore diploid formation in a mating type-de-
361 pendent manner [11]. Using a fragment of the *KISte12*
362 ORF, we constructed a disrupted strain and measured its
363 mating capacity. Fig. 3 shows the mating assay of the
364 *KIste12* mutant. Inactivation of *KISte12p* has a strong
365 effect on the mating efficiency of *K. lactis* cells, indicating
366 that this product is essential for proper mating. By PCR-
367 mediated amplification we subcloned the *KISte12* gene
368 and its promoter region in a multicopy plasmid. Wild-
369 type cells overexpressing *KISte12p* (*KISte12^h* in Fig. 3)
370 showed increased mating efficiency compared to wild-type
371 alone (Fig. 3), and increased expression of *KIFUS1* 1.7-
372 fold compared to cells treated with α pheromone and 20-
373 fold compared to non-stimulated cells (Table 3). Taking
374 the above results together, we conclude that *KISte12p* fac-
375 tor is required for pheromone-stimulated expression of
376 *KIFUS1*. Overexpression of *KISte12* bypasses pheromone
377 stimulus and *KISte12*-activated expression of *KIFUS1* is
378 required for proper mating of *K. lactis* haploid cells. 379

380 3.6. Expression of the KIGpa1^{Q298L} allele fails to induce 381 mating and *KIFUS1* expression in a Δ *KIste12* strain

382 As noted above, the α G α^{Q298L} active allele induces
383 *KIFUS1* expression and restores mating in a Δ *KIga1p*
384 strain. Furthermore, *KISte12p* is also required for *KIFUS1*
385 induction and mating. We then investigated if the α -
386 *Fus1* pathway requires the *KISte12p* transcription factor.
387 In a diploid formation experiment, we mated a Δ *KIste12*
388 strain expressing, in a multicopy fashion, the α active
389 allele, with a wild-type tester strain. The KIGpa1^{Q298L} sub-
390 unit failed to restore mating of the sterile Δ *KIste12* mu-
391 tant; in addition, KIGpa1^{Q298L} also failed to induce
392 *KIFUS1* transcription in cells lacking *KISte12p* (not
393 shown). These results indicate that the KIGpa1 subunit
394 and *KISte12p* participate in the same mating pathway
395 and that *KIFUS1* expression is activated by this phero-
396 mone response system.

397 3.7. *KIFUS1p* localizes in the projection of mating-competent 398 cells

399 Cultures of cells carrying the active form of the α
400 subunit KIGpa1^{Q298L} show increased percentages of un-
401 budding cells, compared to control cells (55% vs. 30%);
402 however, they are still able to divide. Close microscopic
403 examination revealed a small proportion of cells with
404 aberrant morphology. Some of these cells resemble the
405 well characterized "shnnoo" morphology of *S. cerevisiae*
406 cells activated for mating by either pheromone treatment,
407 α inactivation or overexpression of G β subunit [36]. We
408 determined the presence and distribution of *KIFUS1p*
409 in cells expressing the KIGpa1^{Q298L} subunit by means of
410 the *Fus1*-GFP fusion protein. Fig. 4 shows that fluores-
411 cence accumulates in a ring pattern in budding cells, while



1 Fig. 3. Effect of disruption and overexpression of *KISte12* on mating.
2 Strains were grown on a plate of selective medium for 24 h and then
3 replica plated to SD plates plus the required amino acids, which con-
4 tained a lawn of strain 12/8. Mating was carried out overnight at 30°C.
5 Diploids were selected by replica plate on SD supplemented with uracil.
6 Wild-type (WT), 155 (*Mata*, [YEpKD]); *ste12Δ*, 155-512 (*Mata*,
7 *ste12Δ*UR:0; [YEpKD]); *STE12^h*, 155 (*Mata*, [YEpKD*Ste12*]).



Fig. 4. Distribution of KIFus1p measured by means of KIFus1-GFP fusion. Cells cotransfected with YE_pKDGGpa1* (KIGpa1^{979ML}) and pKIFus1-GFP were grown until mid-exponential phase in selective medium for plasmids, washed twice, collected and fixed for examination. Pictures were generated by confocal microscopy.

cells that show an elongated form clearly accumulate fluorescence in the projection, suggesting differential distribution of Fus1p in cells in different stages of development for mating. This last observation, together with the effect that disruption of the *Kifus1* gene has on mating, strongly suggests that the KIFus1p participates in membrane fusion of *K. lactis* haploid cells.

4. Discussion

In the present work we show evidence of a protein required for proper mating, whose expression is induced by the pheromone response pathway of *K. lactis*. From the structural point of view, KIFus1p shows a secondary structure similar to ScFus1p, even though the identity of the amino acid sequences between these two proteins is low. As well as ScFus1p, the primary structure of KIFus1p predicts a membrane protein with a single plasma membrane-spanning segment, leading to an amino-terminus that faces the periplasm and a long carboxy-terminus pointing to the cytoplasmic side. Although no significant homology was found in the amino-terminus of the KIFus1p and ScFus1p proteins, the presence of a number of serine and threonine residues in the amino-terminus of KIFus1p suggests that this protein may also be glycosylated and projected to the periplasmic space, like ScFus1p [31]. The highest identity between both proteins was found in three regions, which lay in the cytoplasmic portions. One is located within KIFus1p residues 204-227, the second within residues 270-286 and the third at the very last 60 residues of the carboxy-terminus. This last region ap-

pears to contain an SH3 domain [37] characteristic of motifs involved in protein-protein interactions of molecules that participate in control of cytoskeletal organization [38]. Fluorescence determination of KIFus1-GFP fusions suggests that the native protein localizes in the plasma membrane in mating-activated cells and moves to the cell projection in elongated cells. In the light of expression experiments and the phenotype of the *Kifus1* mutant, this last observation is in agreement with the proposed role of the Fus1 protein in cell conjugation.

The pheromone response in *S. cerevisiae* is initiated by interaction between extracellular pheromone molecules and the pheromone receptor. Transduction of this signal occurs in conjunction with a G protein coupled to the receptor. The G β moiety of the G protein transduces the signal to a MAP kinase module. The output of the mating pathway involves cell cycle arrest due to inhibition of cyclin activity through Far1p, and a variety of cell changes, including synthesis of the Fus1 protein that facilitates cell-cell adhesion prior to mating. Fus1p is a member of the set of genes induced at the transcriptional level by sexual pheromone [39]. Cell fusion is likely to be mediated by vesicles that become clustered and aligned across the zone of cell fusion. In *S. cerevisiae*, Fus1p appears to be important in localizing the vesicles to the zone of cell fusion [40]. Consistent with its role, inactivation of ScFus1p results in defective haploid mating and diploid formation. Fus1p-deficient mutants show only moderate mating impairment when the two mating partners harbor the mutated allele and this defect is practically imperceptible in crosses between a wild-type strain and one *fus1* partner [17]. This observation could be explained by the fact that there are several other genes involved in the cell fusion process that can take over the lack of the Fus1 protein. For example, it has been shown that expression of *FUS1* partially suppresses *fus1* mutant and expression of *FUS2* partially suppresses *fus1* mutant [17], as well as a number of other fusion-defective mutants [40]. Here we described that the mating defect of the *S. cerevisiae fus1* mutant is significantly reversed by expression of *KIFUS1*, strongly suggesting that this latter protein might have an equivalent role in the cell conjugation process of *K. lactis* to that of ScFus1p in *S. cerevisiae*. Similar to *S. cerevisiae*, inactivation of the *Kifus1* gene significantly affects mating, not only when both mating parents harbor mutated alleles, but also between wild-type and *fus1* parents. Still, in these latter crosses diploid formation occurs suggesting that, analogous to what happens in *S. cerevisiae*, some other (as yet) unidentified gene products might be participating in the cell fusion process in *K. lactis*. In fact, a sequence related to *ScFUS2* (EMBL accession number AL430197) was identified by the random sequencing project of the *K. lactis* genome [22]. Thus, functional redundancy between *KIFUS1* and the putative *KIFUS2* might be expected, like that observed with their *S. cerevisiae* counterparts. The fact that the *K. lactis* and *S. cerevisiae* ge-

497 nomos show similar degrees of gene redundancy [41] sup-
498 ports this latter hypothesis.

499 The components of the pheromone response pathway
500 that regulate mating in *K. lactis* have just started to be
501 identified. This mating pathway is positively controlled by
502 the $G\alpha$ subunit of the heterotrimeric G protein [20]. Mutants
503 defective in the KIGpa1 subunit mate at a lower level
504 than wild-type cells and dominant active alleles trigger
505 conjugation of haploid cells. The active signaling role
506 played by the Gpa1p subunit is in contrast to *S. cerevisiae*
507 where the G β y dimer signals mating [3] and is analogous
508 to the role that Gpa1p subunit plays in *S. pombe* [42,43].
509 Here we have shown that a mutant defective in KIFus1p is
510 defective in mating, that an active allele of $G\alpha$ induces
511 *KIFus1* expression and mating and that the K1Stel2 pro-
512 tein is required for both mating and *KIFus1* induction. The
513 above observations sustain the model that mating phero-
514 mone stimulates a pathway where a predicted receptor
515 activates a G protein, the activated $G\alpha$ subunit in turn
516 transduces the mating signal and induces expression of
517 genes required for mating, i.e., *KIFUS1*, via the K1Stel2p
518 transcription activator. Whether G β and/or G γ subunits
519 are implicated in this systems or KIGpa1p functions as
520 solo $G\alpha$ subunit, similar to small GTP binding proteins
521 such as Ras, remains to be investigated. In the way to
522 elucidate novel protein relationships in the heterotrimeric
523 G protein-mediated transduction pathways in *K. lactis*,
524 this report shows that KIFus1p is an invaluable tool as
525 reporter gene for the pheromone response pathway.

526 Acknowledgements

527 We acknowledge technical assistance of Mrs. Soledad
528 Guevara and Mrs. Marisela Bolaños. We acknowledge
529 technical assistance of the staff of the Molecular Biology
530 Facility (IFC) for oligodeoxynucleotide synthesis and se-
531 quencing. Sequence analysis was done by the staff of the
532 Computing Facility (IFC). Microscopic experiments were
533 done with the assistance of the staff of the Microscopy
534 Facility (IFC). This work was supported by Grant
535 400346-5-28015N from CONACyT and Grants 102369
536 and 202336 from PAEP, UNAM, to A.S.-T. and A.L.
537 respectively. A.L. acknowledges the scholarships received
538 from CONACyT (1182690) and DGEPI, UNAM
539 (71980007).

540 References

- 541 [1] Gustin, M.C., Alberny, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998)
542 MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Micro-*
543 *biol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264-1300.
544 [2] Dietzel, C. and Kurjan, J. (1987) The yeast SCG1 gene: a G α -like
545 protein implicated in the a- and α -factor response pathway. *Cell* 50,
546 1001-1010.
547 [3] Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L.,

- 548 Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P. and MacKay, V.L. (1989) The
549 *Ste2* and *Ste18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of
550 the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* 56, 467-477.
551 [4] Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and
552 more. *Cell* 80, 187-197.
553 [5] Dolan, J.W., Kirkmut, C. and Fields, S. (1989) The yeast Ste12
554 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction.
555 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5703-5707.
556 [6] Kronstad, J.W., Holly, J.A. and Mackay, V.L. (1987) A yeast oper-
557 ator overlaps an upstream activation site. *Cell* 50, 369-377.
558 [7] Van Arsdell, S.W. and Thorne, J. (1987) Hormonal regulation of
559 gene expression in yeast. In: *Transcriptional Control Mechanism*
560 (Granner, D., Rosenfeld, M.G. and Chang, S., Eds.), pp. 325-332.
561 Alan R. Liss, New York.
562 [8] Dolan, J.W. and Fields, S. (1990) Overproduction of the yeast Ste12
563 protein leads to constitutive transcriptional induction. *Genes Dev.* 4,
564 492-502.
565 [9] Song, O., Dolan, J.W., Yuan, Y.O. and Fields, S. (1991) Pheromone-
566 dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates
567 with transcriptional activation. *Genes Dev.* 5, 741-750.
568 [10] Jarvis, E.E., Clark, K.L. and Sprague, G.F. (1989) The yeast tran-
569 scription factor PRFTF, a homolog of the mammalian serum re-
570 sponse factor, is encoded by the *ACM1* gene. *Genes Dev.* 3, 936-
571 945.
572 [11] Yuan, Y.O., Stroke, I.L. and Fields, S. (1993) Coupling of cell iden-
573 tity to signal response in yeast: interaction between the $\alpha 1$ and Ste12
574 proteins. *Genes Dev.* 7, 1584-1597.
575 [12] Jackson, C.L. and Hartwell, L.H. (1990) Courtship in *S. cerevisiae*:
576 both cell types choose mating partners by responding to the strongest
577 pheromone signal. *Cell* 63, 1039-1051.
578 [13] Valtz, N., Peter, M. and Herskowitz, J. (1995) *Farl1* is required for
579 oriented polarization of yeast cells in response to mating phero-
580 mone. *J. Cell Biol.* 128, 779-792.
581 [14] Brizzio, V., Gammie, A.E., Nijbroek, G., Michaelis, S. and Rose, M.D. (1996) Cell fusion during yeast mating requires high levels of
582 α -factor mating pheromone. *J. Cell Biol.* 135, 1727-1739.
583 [15] Berlin, V., Brill, J., Truchart, J., Boeke, J. and Fink, G.R. (1991)
584 Genetic screens and selections for cell and nuclear fusion mutants.
585 *Methods Enzymol.* 194, 774-792.
586 [16] Elion, E.A., Griatzi, P.L. and Fink, G.R. (1990) *Fus3* encodes a cdc2/
587 CDC28 related kinase required for the transition from mitosis into
588 conjugation. *Cell* 60, 649-664.
589 [17] Truchart, J., Boeke, J.D. and Fink, G.R. (1987) Two genes required
590 for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-
591 induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2316-2328.
592 [18] Bardwell, L., Cook, J.G., Inouye, J.C. and Thorne, J. (1994) Signal
593 propagation and regulation in the mating pheromone response path-
594 way of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Biol.* 166, 363-379.
595 [19] Elion, E.A., Satterberg, B. and Kranz, J.E. (1993) Fus3 phosphor-
596 ilates multiple components of the mating signal transduction cascade:
597 evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell* 4, 495-510.
598 [20] Saviñón-Tejada, A., Ongay-Larios, L., Valdés-Rodríguez, J. and Cur-
599 ria, R. (2001) The *KIGpa1* gene encodes a G-protein α subunit that is
600 a positive control element in the mating pathway of the budding
601 yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 183, 229-234.
602 [21] Brake, A., Irvine, B., Masaryk, F. and Shultz, K. (1988) Structure of
603 genes encoding precursors of two *Kluyveromyces lactis* transported
604 proteins. *Yeast* 4, S436.
605 [22] Bolotin-Fukuhara, M., Toffano-Nioche, C., Artiguenave, F., Duch-
606 ateau-Nguyen, G., Lemarre, M., Marmesse, R., Monrocher, R.,
607 Robert, C., Termier, C., Wincker, P. and Wesloski-Louvet, M. (2001)
608 Genomic exploration of the hemiascomycete yeast: 11.
609 *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Lett.* 487, 66-70.
610 [23] Saviñón-Tejada, A., Ongay-Larios, L., Ramirez, J. and Curria, R. (1992)
611 Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in
612 the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*.
613 *Yeast* 12, 1125-1133.

TESIS CON
FALLA DE JAGEN

- 615 [24] Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New
616 heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in
617 *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 10, 5251-5258.
- 618 [25] Ongay-Larios, L., Saviñón-Tejeda, A., Williamson Jr., M.J., Durán-
619 Avelar, M.J. and Coria, R. (2000) The Leu-132 of the Ste4(G β) sub-
620 unit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 α
621 factor receptor during the mating pheromone response in yeast.
622 FEBS Lett. 467, 22-26.
- 623 [26] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Clon-
624 ing: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Labora-
625 tory Press, Plainview, NY.
- 626 [27] Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J. (1986) Methods in Yeast
627 Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- 628 [28] Amberg, D.C., Basart, E. and Botstein, D. (1995) Defining protein
629 interactions with yeast actin in vivo. Nat. Struct. Biol. 2, 28-35.
- 630 [29] Petersen, J., Weiglun, D., Egel, R. and Nielsen, O. (1995) Character-
631 ization of *fus1* of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally
632 controlled function needed for conjugation. Mol. Cell. Biol. 15,
633 3697-3707.
- 634 [30] Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying
635 the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132.
- 636 [31] Trueheart, J. and Fink, G.R. (1989) The yeast cell fusion protein
637 FUS1 is O-glycosylated and spans the plasma membrane. Proc.
638 Natl. Acad. Sci. USA 86, 9916-9920.
- 639 [32] McCaffrey, G., Clay, F.J., Kelsay, K. and Sprague Jr., G.F. (1987)
640 Identification and regulation of a gene required for cell fusion during
641 mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 7,
642 2680-2690.
- 643 [33] Elion, E.A., Trueheart, J. and Fink, G.R. (1995) Fus2 localizes near
644 the site of cell fusion and is required for both cell fusion and nuclear
645 alignment during zygote formation. J. Cell Biol. 130, 1283-1296.
- 646 [34] Wesołowski-Louvel, M., Breunig, K.D. and Fukuhara, H. (1996)
647 *Kluyveromyces lactis*: Genetics, Biochemistry and Molecular Biology
648 of Non-conventional Yeast. Springer-Verlag, Berlin.
- [35] Dohlman, H.G., Song, J., Ma, D., Courchesne, W.E. and Thorner, J. 649
(1996) Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast 650
Saccharomyces cerevisiae: expression, localization, and genetic inter- 651
action and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha sub- 652
unit). Mol. Cell. Biol. 16, 5194-5209. 653
- [36] Dohlman, H.G. (2002) G proteins and pheromone signaling. Annu. 654
Rev. Physiol. 64, 129-152. 655
- [37] Rodaway, A.R.F., Sternberg, M.J.E. and Bentley, D.L. (1989) Simi- 656
larity in membrane proteins. Nature 342, 624. 657
- [38] Mayer, B.J. and Baltimore, D. (1993) Signaling through SH2 and 658
SH3 domains. Trends Cell Biol. 3, 8-13. 659
- [39] Hagen, D.C., McCaffrey, G. and Sprague Jr., G.F. (1991) Pheromone 660
response elements are necessary and sufficient for basal and phero- 661
mone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces ce- 662*
revisiae. Mol. Cell. Biol. 11, 2952-2961. 663
- [40] Gammie, A.E., Brizzio, V. and Rose, M.D. (1998) Distinct morpho- 664
logical phenotypes of cell fusion mutants. Mol. Biol. Cell 9, 1395- 665
1410. 666
- [41] Llorente, B., Durrens, P., Malpertuy, A. and Aigle, M. et al. (2000) 667
Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeast: 20. Evolution 668
of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS 669
Lett. 487, 122-133. 670
- [42] Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harushima, T., Shen, 671
W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J. (2000) Signal 672
transduction cascades regulating fungal development and virulence. 673
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 746-785. 674
- [43] Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. and Kaziro, Y. (1991) 675
Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein alpha 676
subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating 677
and sporulation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5877- 678
5881. 679
680

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN