



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Función de la cinasa K1Ste20p en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *Kluyveromyces lactis*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Biol. Nancy Guadalupe Velázquez Zavala

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Roberto Coria Ortega

MÉXICO, D.F.

Abril, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



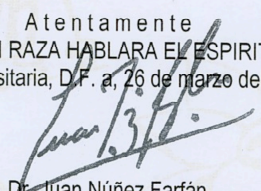
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 06 de noviembre del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Nancy Guadalupe Velázquez Zavala** con número de cuenta **96177101** con la tesis titulada: "**Función de la cinasa K1St₂₀p en el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento en *Kluyveromyces lactis***" bajo la dirección del **Dr. Roberto Coria Ortega**.

Presidente:	Dra. Alicia González Manjarrez
Vocal:	Dr. Roberto Hernández Fernández
Secretario:	Dr. Roberto Coria Ortega
Suplente:	Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Suplente:	Dra. María Eugenia Torres Márquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 26 de marzo del 2007


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

Mi más sincero y profundo agradecimiento a mis padres por estar siempre al pendiente y hacer de mi una mujer de provecho; y por compartir los momentos felices y por no abandonarme en los más difíciles.

Gracias a mi hermano Luis porque aún cuando no estuvo en presencia conmigo siempre estuvo al pendiente de mí.

Agradezco a una persona muy especial que ha estado conmigo a lo largo de la realización de este trabajo por aguantarme, escucharme, apoyarme, porque además de ser mi novio es mi mejor amigo ¡Gracias mi amor por este tiempo juntos!

Agradezco al Dr. Roberto Coria por permitirme ser parte de su laboratorio, aceptar ser mi tutor. y por estar siempre al pendiente de la realización de este trabajo.

Gracias a la Dra. Laura Kawasaki por su invaluable colaboración para realizar este trabajo, por su paciencia y por su disposición a ayudarme a salir de la ignorancia. ¡¡ Gracias Laurita !!

Gracias a la Dra. Alicia Gonzalez, Dra Maria Eugenia Torres, Dr. Roberto Hernández y al Dr. Gonzalo Castillo por sus aportaciones a este trabajo y por aceptar ser parte de jurado.

Gracias a las chicas de la unidad de biología molecular; Dra. Laura Ongay, Lupita y Mine por su apoyo con los secuencias y la síntesis de oligonucleótidos.

Gerardo gracias por esas tardes tan amenas en el laboratorio y por tu muy particular sentido del humor.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio; Laurita, Mary, Edith, Paco, Miriam y Rocio por hacer placentera mi estancia en este lugar.

Gracias a mis amigos: Adi, Editha, Erika, Elvis, Carlos, Claus, Blanca, Rosario, Gaby, Marisela, Hugo, Mariela, Noe.

Gracias a cada una de las personas que por razones de memoria en este momento no puedo recordar.

Agradezco a la familias Vazquez-Velázquez, De Paz-Zavala y Hernandez-Zavala por su comprensión, cariño, apoyo y por estar siempre conmigo a pesar del tiempo y la distancia. ¡¡¡ los quiero mucho !!!!!.

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Características generales de <i>Kluyveromyces lactis</i>	3
1.2 Ciclo de vida de las levaduras	4
1.2.1 Fase Vegetativa	4
1.2.2 Fase Sexual	6
1.3 Vía de respuesta a feromonas	7
1.3.1 Respuesta a feromonas en <i>K. lactis</i>	10
1.4 Cinasas activadas por p21	13
1.5 Cinasa Ste20p	13
2. Planteamiento del Problema	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	20
5. Materiales y Métodos	21
5.1 Cepas	21
5.1.1 Medios de cultivo para levaduras y bacterias	21
5.1.2. Plásmidos	21
5.2 Amplificación de gen <i>KISTE20</i> por PCR	22
5.3 Manipulación de DNA	22
5.4 Clonación y secuenciación del gen <i>KISTE20</i>	23
5.5 Construcciones de <i>KISTE20</i>	23
5.5.1 Interrupción	23
5.5.2 Construcciones para doble híbrido	23
5.6 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	23
5.7 Transformación en levaduras	24
5.8 Purificación de ácidos nucleicos	24
5.9 Hibridaciones tipo Southern blot y Northern blot	24
5.10 Ensayos de apareamiento	25
5.11. Ensayos de interacción proteína - proteína	25
5.12 Ensayos de actividad de β - galactosidasa	26
6. Resultados	27
6.1 Clonación de gen <i>KISTE20</i>	27
6.2 Análisis de la secuencia de <i>KISTE20</i>	28

6.3	Interrupción del gen <i>KISTE20</i>	30
6.4	Expresión del gen <i>KISTE20</i>	32
6.5	Fenotipo de una mutante $\Delta Kiste20$	33
6.6	La técnica del doble híbrido	34
6.6.1	Construcciones para medir la interacción de KISTe20p con los componentes del sistema de respuesta a feromonas	35
6.6.2.	Interacción entre KISTe20p y el COOH-KISTe20p con la subunidad $G\beta$ de la proteína G.	37
6.6.3.	Interacción de KISTe20p con la subunidad $G\alpha$ de la proteína G.	39
6.6.4.	Interacción entre KISTe20p y la MEK cinasa KISTe11p.	40
7.	Discusión	41
8.	Conclusiones	47
9.	Perspectivas	48
10.	Bibliografía	49

RESUMEN

En *Kluyveromyces lactis* hay dos tipos de células haploides, *Mata* y *Mata* las cuales pueden aparearse en respuesta a feromonas sexuales e iniciar un ciclo de reproducción sexual. En *K. lactis* se han identificado la gran mayoría de los componentes de esta vía de señalización, cada tipo celular secreta feromonas peptídicas conocidas como α y α que son reconocidas por el tipo celular opuesto. Estos péptidos son reconocidos por receptores específicos presentes en la membrana plasmática de la célula del tipo opuesto esto inicia una serie de eventos como la interrupción en la fase G1 del ciclo celular y cambios en la morfología de las células inducidos por genes requeridos para su fusión. Los receptores Ste2p y Ste3p están acoplados a proteínas G heterotriméricas, las cuales están compuestas de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. Ste20p es una proteína cinasa de tipo PAK y es un efector de $G\beta$ en el sistema de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* y activa al módulo de MAPKs. *K. lactis* es una levadura que está estrechamente emparentada con *S. cerevisiae*, sin embargo, su sistema de respuesta a feromonas presenta diferencias importantes, por ejemplo, en *K. lactis* tanto la subunidad $G\beta$ como la subunidad $G\alpha$ transducen la señal de la feromona por lo que ambas proteínas podrían activar efectores, mientras que en *S. cerevisiae* la señal solo es transmitida por $G\beta\gamma$. En este trabajo se realizó la caracterización genética y física del gen *KISTE20*. Este gen codifica para una proteína de 939 aminoácidos que presenta un 50% de identidad con su homólogo en *S. cerevisiae*. Los ensayos de apareamiento con mutantes ($\Delta Kiste20$) mostraron un fenotipo de esterilidad, lo cual indica que esta cinasa es esencial en la respuesta a feromonas de *K. lactis*. El análisis de la secuencia de *KISte20p* se identificó una secuencia altamente conservada que está involucrada en la asociación con la subunidad $G\beta$ (*KISte4p*) de *K. lactis*, por lo que pensamos que *KISte20p* es efector de esta subunidad. Los ensayos de interacción por el doble híbrido indican que la subunidad *KIG β* interactúa fuertemente con la proteína *KISte20p*. El dominio C-terminal de *KISte20p* donde se encuentra el probable sitio de interacción con *KIG β* es suficiente para que se lleve a cabo la asociación entre las dos proteínas. En *K. lactis* la subunidad $G\alpha$ también es capaz de transmitir la señal a un efector todavía desconocido. En este trabajo se observó interacción física entre *KISte20p* y *KIGpa1*, y además que esta asociación ocurre de manera diferencial con $G\alpha$ activa (unida a GTP) y $G\alpha$ inactiva (unida a GDP). Estas observaciones sugieren que la transmisión de la señal inducida por feromonas en *K. lactis* involucra la interacción regulada entre $G\alpha$ y $G\beta$ con la cinasa *KISte20p*. Finalmente, por ensayos de doble híbrido se determinó que *KISte20p* se asocia con *KISte11p*^{MEKK} el primer componente del módulo de MAPK, lo que sugiere que *KISte20p* puede ser la conexión entre la proteína G y el módulo de MAPK.

ABSTRACT

In the yeast *Kluyveromyces lactis* there are haploid cells of two mating types *Mata* and *Mata* α , which can mate with each other in response to the sexual pheromones. In *K. lactis* the main components of this signalling pathway have been identified. Each cell type secretes diffusible peptide pheromones, known as **a** and α factors which are recognized by cells of the opposite cell type. Sexual factors bind to receptors expressed at the surface of the opposite cell type, initiating a well regulated mating process which includes growth arrest of cells in G1 phase and morphological changes leading to plasma membrane and nuclear fusion. Ste2p and Ste3p are G protein coupled receptors which activate the heterotrimeric G protein, composed of $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$ subunits. The Ste20p kinase, a member of the p-21 activated kinase (PAK), is a $G\beta\gamma$ effector in the pheromone response pathway of *S. cerevisiae*. Ste20p activates kinases located downstream in the so called, MAPK module. *K. lactis* is a budding yeast closely related to *S. cerevisiae*, however its pheromone response pathway presents some important differences, for example, both the $G\alpha$ and $G\beta$ subunits trigger the pheromone response pathway in *K. lactis*, possibly activating specific effectors, while in *S. cerevisiae*, only $G\beta$ triggers the signal. In this work we show the physical and genetic characterization of the *KISTE20*. This gene encodes a putative 939 amino acid residues peptide that is 50% identical to its *S. cerevisiae* counterpart. Mating assay carried out with disruption mutants ($\Delta Kiste20$) showed a complete sterile phenotype. These observations indicate that KISTe20p has an essential role in the pheromone response pathway in *K. lactis*. Sequence analysis of KISTe20p indicates high conservation of residues involved in the association with the $G\beta$ - subunit, pointing to KISTe20p as a possible $G\beta$ effector. The two-hybrid interaction assay detected that these two proteins interact strongly in *K. lactis*. The C-terminus domain of KISTe20p which contains the putative $G\beta$ binding domain is sufficient element to support interaction with $G\beta$. In *K. lactis* the $G\alpha$ subunit of the heterotrimeric G protein is also able to trigger the pheromone signal, through an unknown effector. In this work we found physical interaction between KIGpa1p and KISTe20p, and we detected that KISTe20p is able to discriminate between active (GTP-bound) and inactive (GDP-bound) $G\alpha$ subunits. These observations suggest that the transmission of the pheromone signal in *K. lactis* involves the regulated interactions between $G\alpha$ and $G\beta$ subunits with the KISTe20p kinase. Finally, by the two hybrid system we determined that KISTe20p associates with KISTe11p^{MEKK}, the first component of the MAPK module, suggesting that Ste20p forms the bridge that connects the G protein with the MAPK module.

1. INTRODUCCION.

1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis es una levadura que se reproduce por gemación, forma parte del grupo de los ascomicetos del orden de los endoascomicetales y se ha estudiado desde principios de los años 60's. Se ha aislado de diversos nichos ecológicos, pero algunas cepas se desarrollan en la leche y productos lácteos y son capaces de fermentar la lactosa; característica que distingue a *K. lactis* de otras levaduras (Herrera *et al.*, 1998).

K. lactis presenta un metabolismo fermentativo-respiratorio y la mayoría de las cepas puede crecer en fuentes de carbono fermentables. El bloqueo de la respiración por la pérdida de DNA mitocondrial tiene un efecto letal porque esta levadura no es capaz de crecer en condiciones anaerobias estrictas (Wesolowski *et al.*, 1996).

K. lactis tiene un genoma que mide 10.5 Mb y está organizado en 6 cromosomas que miden de 1 a 3 Mb a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae* la cual tiene 17 cromosomas (Sor *et al.*, 1989). El DNA mitocondrial de *K. lactis* es una molécula circular que mide cerca de 39 kb y hay aproximadamente 30 copias por genoma haploide lo que corresponde al 10% del genoma total. También se ha aislado el plásmido pKD1 con origen de replicación de 2 μ m y presenta un sistema especie-específico llamado "DNA-killer" formado por un par de plásmidos lineales pGKL1 (8.8 kb) y pGKL2 (13.4 kb). Estos plásmidos están localizados en el citoplasma y codifican para DNA y RNA polimerasas y para un complejo tóxico anti levaduras conocido como zymocina (Gunge *et al.*, 1981).

Se ha reportado que *K. lactis* es un buen modelo para la producción de gran cantidad de proteínas heterólogas como la interleucina 1 β , albúmina del sérica humana, la α -amilasa de ratón, la glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C, así como la β -lactamasa de bacterias y hongos entre otras (van Ooyen *et al.*, 2005)

K. lactis es un excelente modelo para estudiar aspectos fisiológicos únicos de especies “petite” y “crabtree” negativas ya que a diferencia de *S. cerevisiae* en *K. lactis* el sistema respiratorio no se encuentra bajo el control del sistema de represión por glucosa, por el contrario, está adaptada a condiciones estrictamente aeróbicas (Schaffrath *et al.*, 2000).

1.2 CICLO DE VIDA DE LAS LEVADURAS

Las levaduras son organismos eucariotes unicelulares que agrupan una gran variedad de hongos entre los cuales se encuentran especies patógenas y de importancia industrial. En la naturaleza se pueden encontrar en estado haploide (tienen un solo juego de cromosomas) o diploide (poseen dos copias de cada cromosoma). Cuando las células se encuentran en estado haploide pertenecen a uno de dos tipos celulares, a o α , los cuales contienen la misma información genética y son indistinguibles morfológicamente, la diferencia entre ellas radica en la expresión de diferentes genes que determinan el sexo y que no se expresan en células diploides. (Herskowitz, 1988)

1.2.1 FASE VEGETATIVA

La gemación es el procedimiento más común por el cual se lleva a cabo la reproducción asexual en levaduras tanto en células haploides como diploides. El ciclo de división celular comienza cuando hay formación de una o varias gemas que aparecen como pequeñas prominencias en la superficie de las células; al crecer estos brotes o yemas se separan de la célula madre por una constricción en la base. Durante la gemación el núcleo se divide por mitosis; un núcleo pasa a la célula hija y el otro queda en la célula madre y el ciclo puede volver a comenzar (Figura 1a). El resultado de este crecimiento es el incremento exponencial del número de células sin que ocurra intercambio genético entre ellas. La mayoría de las cepas de *K. lactis* se mantienen en estado estable haploide a o α o diploide y son capaces de dividirse por gemación para llevar a cabo su ciclo celular (Pringle *et al.*, 1981).

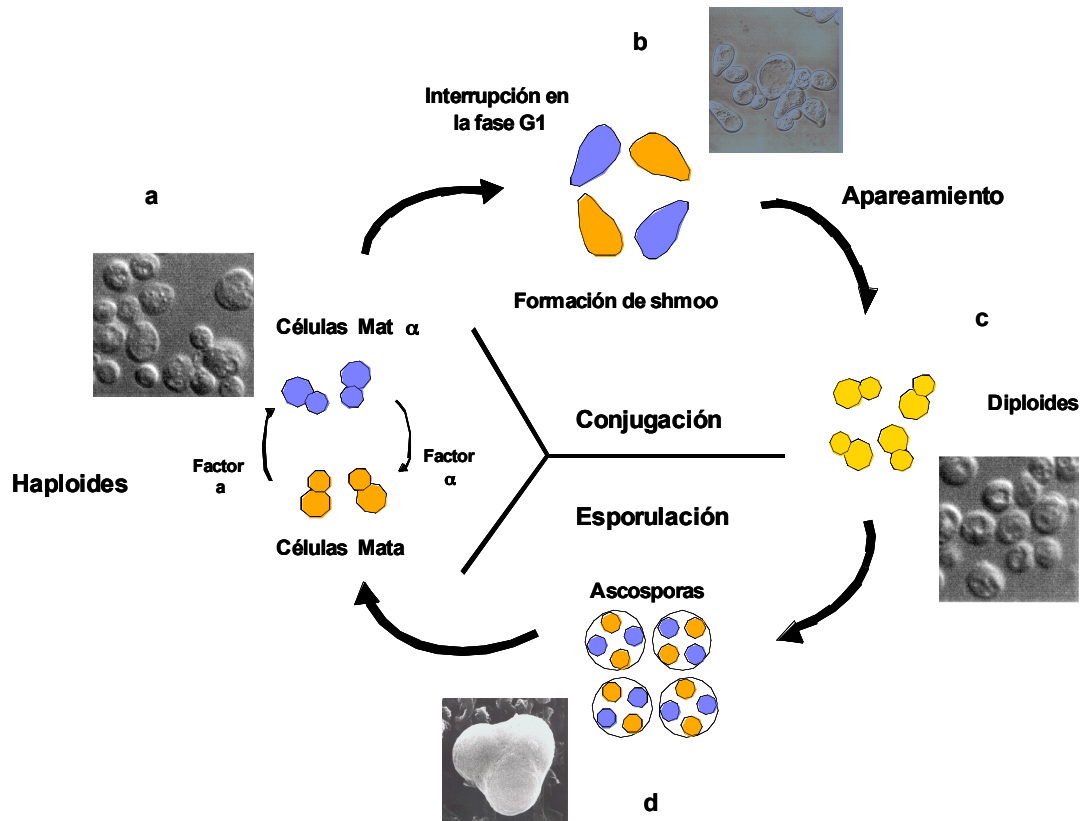


Figura 1. Ciclo celular de las levaduras. a) El ciclo de vida vegetativo durante el cual no se forman elementos de reproducción, consiste simplemente en la división de la célula por gemación y permanecen en estado haploide a o α . b) Cuando dos células de sexo opuesto se encuentran, secretan feromonas que inducen una serie de cambios como la interrupción en la fase G1 del ciclo celular y la formación de shmoo. c) En esta etapa del ciclo ocurre fusión celular y nuclear de las células para la formación de células diploides. d) El proceso de esporulación es la etapa final del ciclo sexual en la cual las ascosporas germinan dando lugar a la formación de células haploides.

1.2.2. FASE SEXUAL

La transición de la fase haploide a la fase diploide ocurre cuando dos levaduras de tipo celular opuesto entran en contacto e inician un ciclo de reproducción sexual (Fincham *et al.*, 1971) lo que conduce a la formación de un cigoto en el cual dos núcleos haploides parentales se fusionan para formar un núcleo diploide. En levaduras el ciclo sexual se divide en dos procesos: conjugación y esporulación (Coria, 1993).

Conjugación sexual

El apareamiento en levaduras está mediado por moléculas difusibles llamadas feromonas y reciben el nombre del tipo celular que los produce **a** o **α** (Manney *et al.*, 1981). Cada una de las células secreta feromonas y el tipo celular opuesto responde a este estímulo (Mackay *et al.*, 1974) y se producen una serie de cambios morfológicos en los cuales la célula detiene su división en la fase G1 del ciclo celular, las células se elongan y adoptan una forma parecida a una pera que se conoce con el nombre de “shmoo” (Figura 1b). Cuando entran en contacto se fusionan tomando una morfología característica y aquí es donde ocurre la fusión de los núcleos para formar una célula diploide (Figura 1c).

El proceso de esporulación se inicia cuando las células diploides se encuentran en presencia de bajos niveles de nutrientes. La transición de la fase diploide a la fase haploide ocurre por meiosis que da como resultado cuatro esporas contenidas en una estructura llamada asca que cuando son liberadas en un ambiente favorable germinan y generan células haploides **a** o **α** que pueden conjugarse y volver a iniciar su ciclo de vida (Figura 1d).

1.3 VIA DE RESPUESTA A FEROMONAS DE APAREAMIENTO

Todos los organismos; bacterias, levaduras hasta mamíferos responden a señales del ambiente extracelular, esas señales se transducen hacia el interior de la célula y esto tiene como consecuencia una alteración en el patrón de expresión genética y en la actividad de proteínas para responder a estos estímulos externos (Banuett, 1998).

La función primaria de una vía de transducción de señales es transmitir la señal de un lugar a otro, en este caso del espacio extracelular al núcleo a través del citosol. Esta cascada de señalización en levaduras se lleva a cabo de la siguiente manera: primero se amplifica la señal, posteriormente se disemina, integra, modula y por ultimo se pierde la sensibilidad (Bardwell, 2005).

La respuesta a feromonas comienza con un receptor membranal acoplado a proteínas G heterotrómicas (GPCR). Dos células haploides de tipo celular opuesto conocido como *MAT α* y *MAT a* secretan pequeños péptidos llamados feromonas o factores α o a , respectivamente. El factor α se une a su receptor específico en las células *MAT a* , mientras que el factor a es reconocido por el receptor de las células *MAT α* . Los receptores a feromonas activan una proteína G heterotrómica que está compuesta por las subunidades $G\alpha$ (codificada por el gen *GPA1*) $G\beta$ y $G\gamma$ (codificadas por los genes *STE4* y *STE18*, respectivamente). Después de la activación, en la subunidad $G\alpha$ hay un cambio de su forma inactiva unida a GDP a una forma activa unida a GTP lo cual ocasiona su disociación del dímero $G\beta\gamma$ (Figura 2) y la señal entonces se transmite y amplifica a través de múltiples proteínas efectoras que se unen a este dímero (Wang, 2004).

$G\beta\gamma$ transmite la señal a través de diferentes efectores: el complejo Ste5 / Ste11, la proteína cinasa Ste20p y el complejo Far1 / Cdc24 (Akada *et al.*, 1996).

$G\beta$ tiene como primer efector a Ste20p, al cual se une a través de un dominio altamente conservado que se localiza en el extremo carboxilo terminal de esta

proteína (Leeuw *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2001; Leberer *et al.*, 2000) (Figura 2, Figura 5).

Ste5p es otra proteína que se une a G β cerca del sitio de unión a Ste20p a través de un dominio RING-H2. Ste5p es una proteína multifuncional que no tiene actividad catalítica y sirve como adaptador ya que se une a G β y acerca a Ste11p^{MEKK} para que sea fosforilada y activada por Ste20p (Figura 2) (Elion, 2001). Ste50 se une constitutivamente a Ste11^{MEKK} a través de un motivo alfa esteril (SAM) localizado en las dos proteínas y contribuye a su activación (Wu *et al.*, 1999). Ste11^{MEKK} activa a Ste7^{MEK} y esta a su vez activa a Fus3^{MAPK} y Kss1^{MAPK} por fosforilación en sus asas de activación. Ste5p interactúa con Ste11^{MEKK}, Ste7^{MEK} y las MAPK's en distintas regiones co-localizando y organizando el componente de proteínas cinasas de la cascada de MAPK (Figura 2) (van Drogen, 2001; Gustin *et al.*, 1998; Herskowitz, 1995).

La proteína cinasa activada por mitógenos Fus3p (MAPK) fosforila a los represores Dig1p y Dig2p, lo que conduce a la disociación del activador transcripcional Ste12p, que se une a una secuencia conservada del DNA conocida como elemento de respuesta a feromonas (PRE) e induce la transcripción de más de 200 genes requeridos para el apareamiento (Figura 2) (Bardwell, 2005).

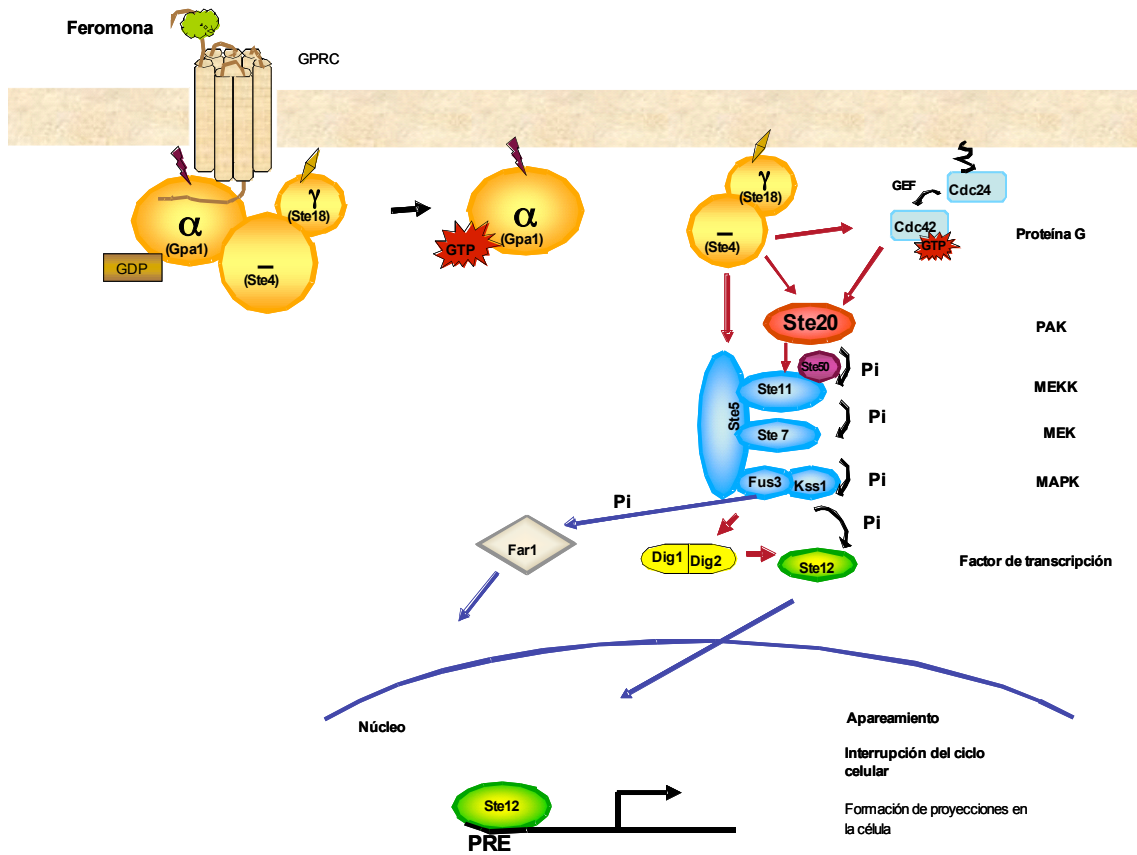


Figura 2. Componentes de la vía de respuesta a feromonas en levaduras. La feromona (α o α) se une a la superficie del receptor (Ste2p o Ste3p) que promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad la subunidad $G\alpha$ (Gpa1) lo que ocasiona que se separe del dímero $G\beta\gamma$ (Ste4 y Ste18) y para interactuar con efectores como Cdc24p para la formación de proyecciones en la célula; con Ste20p y Ste5. para activar el módulo de MAP cinasas para que la MAPK Fus3p fosforile y active al factor de transcripción Ste12p para la transcripción de genes requeridos para el apareamiento. También se requiere la inducción de genes para la fusión celular y nuclear; así como, para la sincronización en el ciclo celular (interrupción en la fase G1) (Elion, 2001).

1.3.1. Respuesta a feromonas en *K. lactis*, similitudes y diferencias con *S. cerevisiae*

En *K. lactis* se han clonado y caracterizado algunos componentes de la vía de respuesta a feromonas y de otros se sabe que existen por homología con la secuencia de los genes que ya se han reportado en *S. cerevisiae* (Coria *et al.*, 2006).

En *K. lactis* hay dos receptores que presentan el 50% de identidad con sus homólogos en *S. cerevisiae*. K1Ste2p que se encuentra en las células *MAT α* y responde a la feromona α y K1Ste3p que está en las células *MAT α* y responde a la feromona α ; la interrupción en estos genes ocasiona que la célula sea incapaz de aparearse (Tabla 1) (Torres-Quiroz *et al.*, 2007) de manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*.

A nivel de la proteína G heterotrimérica se han encontrado algunas diferencias ya que mientras en *S. cerevisiae* $G\alpha$ desempeña un papel negativo, en *K. lactis* se ha visto que la subunidad $G\alpha$ participa en la vía ya que una mutante del gen *GPA1* que codifica para esta proteína da un fenotipo de esterilidad parcial pero es viable (Tabla 1) y en *S. cerevisiae* el fenotipo es letal ya que la célula detiene el ciclo celular en la fase G1 y ya no puede dividirse (Saviñon-Tejeda, 2001).

La subunidad $G\beta$ de *K. lactis* presenta un 52% de identidad con la $G\beta$ de *S. cerevisiae* y el fenotipo de una mutante es similar, las células son estériles pero pueden seguir su reproducción asexual (Tabla 1) (Kawasaki *et al.*, 2005). La subunidad $G\gamma$ codificada por el gen *KISTE18* presenta un 53% de identidad con la subunidad $G\gamma$ de *S. cerevisiae* y en esta levadura se ha visto que es esencial en la vía de respuesta a feromonas ya que una mutante de este gen no se aparea. Sin embargo, en *K. lactis* se ha observado que $G\gamma$ no es esencial en el apareamiento (Tabla 1) (datos no publicados).

Cuando se realiza una interrupción en el gen *KISTE5* que codifica para una proteína de andamiaje la cual une al módulo de MAPK muestra un fenotipo de esterilidad (Tabla 1) (datos no publicados).

Realizando una búsqueda en la base de datos de *K. lactis* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>) se identificó a tres genes que codifican para el módulo de MAP cinasas *KISTE11p*, *KISTE7p* y *KIFUS3p*; los cuales presentan un porcentaje de identidad del 58%, 52% y 69%, respectivamente, con sus homólogos en *S. cerevisiae*. En *K. lactis* de la misma manera que en *S. cerevisiae* el fenotipo observado en mutantes de estos genes ocasiona un fenotipo de esterilidad (Tabla 1) (datos no publicados).

Otro componente que se identificó en el laboratorio es la cinasa *KISte50p* la cual también participa en el apareamiento ya que se demostró que una mutante en este gen es parcialmente estéril (Tabla 1) (datos no publicados).

KISte12p se clonó y se caracterizó y al igual que en *S. cerevisiae* una mutante en el gen que codifica para esta proteína muestra una disminución significativa en el apareamiento (Tabla 1) (Lloret *et al.*, 2003).

Tabla 1. Proteínas que participan en la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*

Proteína	Función	Fenotipo de una mutante
KISte2p / KISte3p	Receptor a feromona	Estéril ^a
KIGpa1p	Subunidad G α . Activa posibles efectores (función +)	Parcialmente estéril ^b
KISte4p	Subunidad G β . Activa efectores (función +)	Estéril ^c
KISte18p	Subunidad G γ	Parcialmente estéril ^d
KISte50p	Posible efector de G α	Parcialmente estéril ^d
KISte20p	Posible efector de G β	Desconocido
KISte5p	Proteína de anclaje	Estéril ^d
KISte11p	MAP cinasa cinasa cinasa o MEKK	Estéril ^d
KISte7p	MAP cinasa cinasa o MEK	Estéril ^d
KIFus3p	Map cinasa MAPK	Estéril ^d
KIFus1p	Proteína de fusión	Estéril ^e
KISte12p	Factor de transcripción	Estéril ^e

^a Torres–Quiroz *et al.*, 2007;

^b Saviñon-Tejeda *et al.*, 2001

^c Kawasaki *et al.*, 2005

^d Datos del laboratorio

^e Lloret *et al.*, 2003

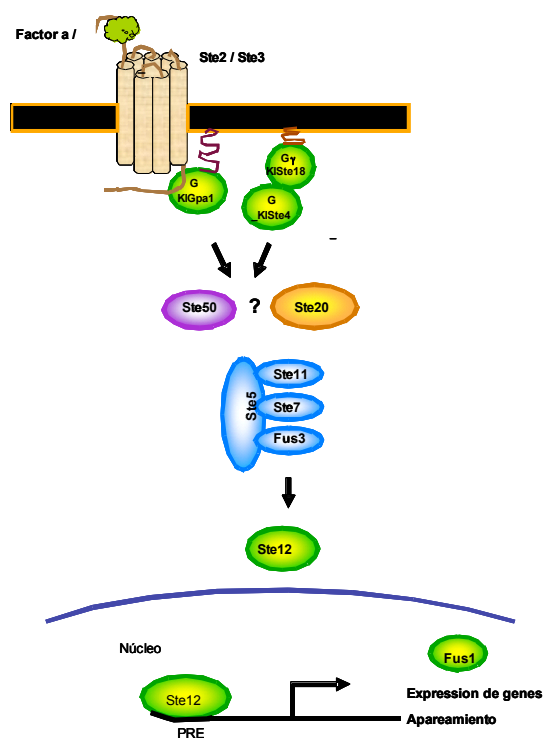


Figura 3. Esquema de la transducción de la señal en la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*.

1.4. Cinasas activadas por p21

Las cinasas activadas por p21 (PAK) son miembros de una familia de proteínas cinasas de serina/treonina definidas por su interacción con GTPasas monoméricas como Cdc42 y Rac (Chong *et al.*, 2001). En mamíferos existen 6 miembros de esta familia (PAK 1-6) (Kumar *et al.*, 2006). Con base en características estructurales y modo de regulación, esas proteínas cinasas pueden ser subdivididas en tres grandes grupos: Las Ste20p /PAK contienen en la región no catalítica amino terminal, un sitio de unión a proteínas G monoméricas como Cdc42p y Rac (CRIB por sus siglas en inglés). Un subgrupo de esas cinasas como Cla4p además del dominio CRIB presentan un dominio de homología a pleckstrina (PH) en la región no catalítica amino terminal. Las proteínas relacionadas con Sos1p no tienen los dominios CRIB y PH pero tienen un carboxilo terminal no catalítico. Las PAKs pueden regular diferentes procesos como la organización de la actina y el crecimiento apical de la célula a través de fosforilación de sustratos como la miosina. Las PAKs también pueden responder a señales mediadas por receptores que ocasionan que sean llevadas a la membrana plasmática y de esta manera puedan activarse; estas proteínas también activan módulos de MAP cinasas en vertebrados y levaduras. (Lei *et al.*, 2000).

1.4.1. Cinasa Ste20p

Ste20p (proteína estéril 20) es un miembro de la familia Ste20/PAK de proteínas cinasas de serina/treonina y están altamente conservadas en las levaduras, hasta el hombre. En levaduras, particularmente *S. cerevisiae* se han descrito otras dos proteínas que pertenecen a esta familia: Cla4p y Smk1p que además de los dominios identificados en Ste20p, presentan una secuencia conservada de homología a Pleckstrina (Hofmann *et al.*, 2004). Se han descrito alrededor de 30 proteínas pertenecientes al grupo de cinasas Ste20p en diferentes grupos de organismos como mamíferos, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, levaduras y otros. Están involucradas en la integración de múltiples señales celulares entre las cuales está la activación de MAPK, el rearrreglo del citoesqueleto, la respuesta a estrés, a citocinas y a mitogénos (Ippeita *et al.*, 2001).

Estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que Ste20p se regula diferencialmente en varias vías que intervienen en el desarrollo en levaduras. En la levadura *S. cerevisiae* Ste20p está involucrada en una serie de procesos celulares como la vía de respuesta a feromonas, cambios morfológicos, crecimiento vegetativo y morfogénesis polarizada (Gustin *et al.*, 1998). En la vía de respuesta a feromonas Ste20p es regulado por su unión a la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica (Song *et al.*, 2001) y esta unión es importante para activar una cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Wu *et al.*, 1995), mientras que en el crecimiento vegetativo y la formación de filamentos la función de Ste20p es regulada por su unión a Cdc42p. Este tipo de regulación diferencial está conservada hasta mamíferos (Herskowitz, 1995).

En *S. cerevisiae* Ste20p se identificó en una búsqueda genética para supresores de defectos en el apareamiento asociados con la expresión de una forma dominante negativa de G β (Ste4p) (Leberer *et al.*, 1992; Ramer *et al.*, 1993). Las células que tienen una mutación en el alelo $\Delta ste20$, no interrumpen el ciclo celular en la fase G1 después de la estimulación con feromona, no forman proyecciones para el apareamiento; por lo tanto no se activa el módulo de MAPKs y no hay transcripción de los genes requeridos para todo el proceso de apareamiento (Hoffman *et al.*, 2004); sin embargo, las células no son completamente estériles posiblemente porque G β este activando otros efectores como Ste5p que pueden activar el módulo de MAPK (Peter *et al.*, 1996).

Ste20 en *S. cerevisiae* es una proteína cinasa de 939 residuos de aminoácidos y está formada por una región regulatoria extremo amino terminal (N-terminal) que comprende de los residuos 1 al 627, y el extremo carboxilo terminal (C-terminal) del residuo 627 al 939 (Song *et al.*, 2001). (Figura 4)

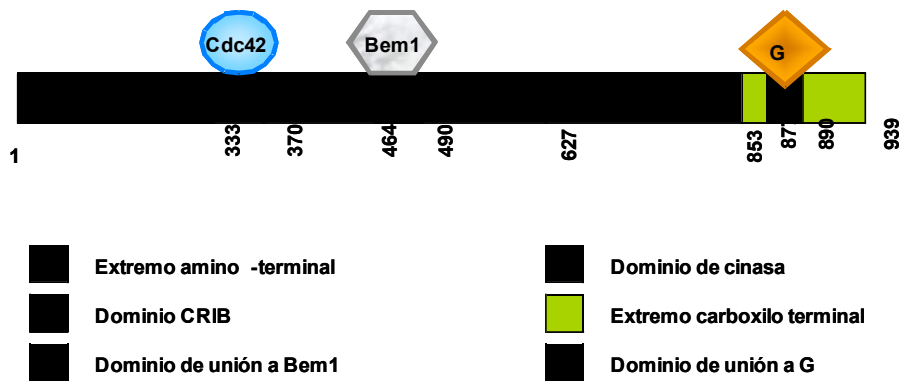


Figura 4. Esquema de Ste20p de *S. cerevisiae* en donde se muestran los dominios de interacción con proteínas de diferentes vías de señalización en las cuales participa. Con Cdc42p y Bem1p interviene en la formación de proyecciones en la célula, y con la subunidad G β en la transducción de la señal en la vía de respuesta a feromonas. Ste20p interactúa con Ste5p, Myo1p y Ste11p pero los sitios de interacción aún no han sido reportados por lo cual no aparecen en el esquema.

En la región N-terminal de Ste20p se identificó un dominio de unión a Cdc42 (CRIB) (Lamson *et al.*, 2002) que está altamente conservado en todas las PAKs. Esta región es una secuencia de 18 aminoácidos localizada entre los residuos 335 y 352 y comprende la secuencia LRISTPYNAKHIIHHVGVD que es homóloga a los sitios de unión a Cdc42p de p65^{PAK} o p120^{PAK} de mamíferos (Leberer *et al.*, 1997; Ash *et al.*, 2002) (Figura 4). Entre los residuos 464 a 490 del N-terminal de Ste20 se identificó y caracterizó funcionalmente un dominio de unión a la proteína Bem1. Este motivo es rico en prolina (PxxP) y es un sitio a través del cual interactúa con el dominio SH3 de la proteína Bem1p (Figura 4), la cual es una proteína que participa en la vía del crecimiento apical (formación de shmoo) (Matthew *et al.*, 2005). Por ensayos de doble híbrido se determinó que la cinasa de anclaje Ste5p y la miosina I también interactúan en esta región con Ste20p.

En el extremo C-terminal, del aminoácido 627 al 853 se encuentra el dominio cinasa de serina/treonina que está subdividido en 11 subdominios conservados. En el subdominio VIII de Ste20p presenta la secuencia peptídica (GTPY/FWMAPE) conservada en todas las cinasas del tipo PAK y es la principal responsable del reconocimiento del sustrato en muchas cinasas. (Sells *et al.*, 1997) (Figura 4).

La transmisión de la señal en el apareamiento requiere que la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica se una a un módulo de MAPK a través de la proteína Ste20p. En un estudio realizado sobre el mecanismo de transducción en la vía de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae*, se identificó el sitio de unión de Ste20p a la subunidad G β (GBB) de la proteína G heterotrimérica dentro del dominio C-terminal no catalítico específicamente en un fragmento de 14 residuos de aminoácidos ANSSLAPLVKLARL el cual está conservado en miembros de la familia PAK/Ste20p (Leeuw *et al.*, 1998, Leberer *et al.*, 2000, Song *et al.*, 2001). (Figura 5).

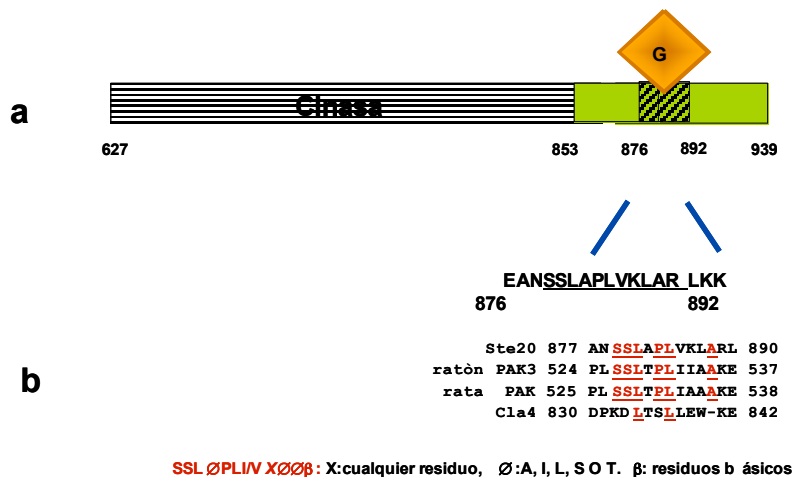


Figura 5 a) Esquema de la región C-terminal donde se encuentra el sitio de unión a la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica (GBB). Se muestran los aminoácidos que conforman este sitio de interacción que se encuentran ubicados entre la posición 877 y 890. b) En este alineamiento se muestra el alto grado de conservación del dominio GBB en cinasas de la familia PAK / Ste20p. Cla4p es una cinasa relacionada con Ste20, sin embargo, no puede interactuar con G β , por lo tanto en una cepa Δ ste20, Cla4p es incapaz de reestablecer la función de Ste20p (Keniry *et al.*, 2003).

Recientemente, se reportó un modelo del complejo formado por G β y Ste20p de *S. cerevisiae* en donde la región de interacción se encuentra entre E876 y K892 y pueden formar puentes de hidrogeno con los residuos R43 y D62 de G β . Otros residuos hidrofóbicos como L880, L884, V885 y V893 del dominio catalítico de Ste20p pueden estar en contacto con G β . Los aminoácidos S879, S880 y P883 de GBB son muy importantes ya que una triple mutante en estos residuos ocasiona que no haya respuesta a feromona ya que Ste20p no se puede unir a G β (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Un cambio de K por E en el residuo 55 evita la formación de puentes de hidrogeno entre K55 y L890 (Figura 6b). Una mutación en el residuo D62 puede desestabilizar el complejo G β /Ste20p ya que no puede unirse a K892. El residuo K55 de G β hace contacto con K891 de Ste20p de manera antiparalela (Figura 6c).

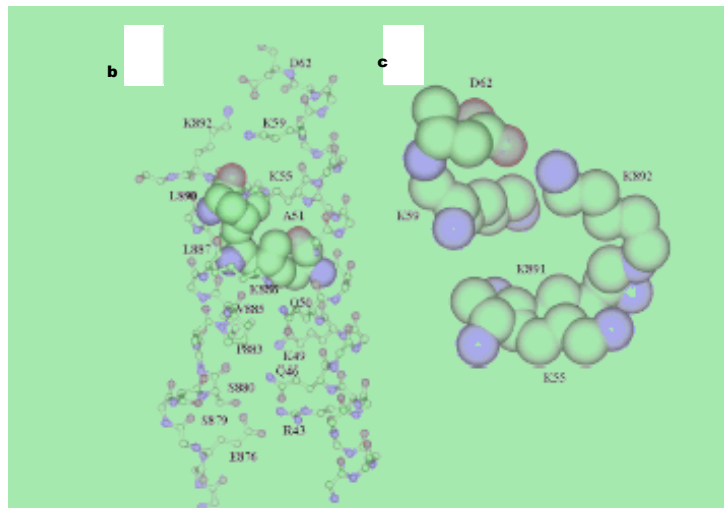
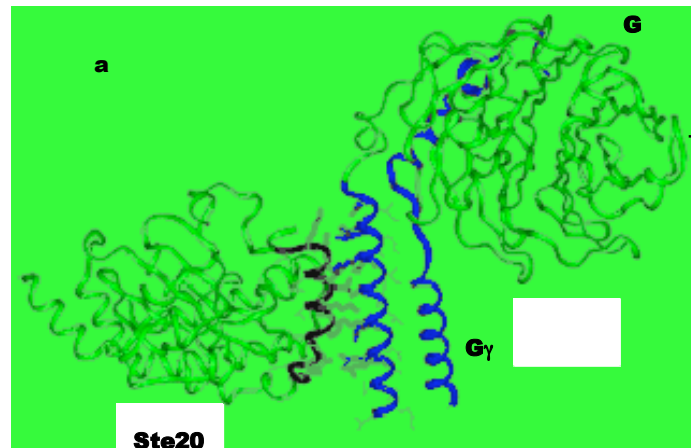


Figura 6. a) Representación en un modelo de listón del complejo Gβ / Ste20p de *S. cerevisiae*. En azul se muestra la región amino terminal de Gβ a través de la cual interactúa con el extremo carboxilo terminal de Ste20p (rojo). En púrpura se muestra la subunidad Gγ que se encuentra unida constitutivamente a la subunidad Gβ. b y c) Representación de la interface de unión de Gβ/Ste20p y los residuos que participan en la interacción entre estas dos proteínas (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ste20p de *S. cerevisiae* pertenece a la familia de proteínas cinasas de tipo PAK las cuales están conservadas desde las levaduras hasta el hombre. Esta proteína es el efector del sistema de transducción en *S. cerevisiae*, se activa por la acción de la subunidad $G\beta$ y regula el módulo de las MAPKs. Ste20p desempeña múltiples funciones entre las cuales está la vía de respuesta a feromonas y crecimiento vegetativo. *K. lactis* es una levadura estrechamente emparentada con *S. cerevisiae*; sin embargo, su sistema de respuesta a feromonas de apareamiento es diferente. En *Kluyveromyces lactis* se ha encontrado que tanto $G\beta$ como $G\alpha$ transducen la señal de la feromona por lo que ambas proteínas activan efectores. Es importante saber entonces si las actividades de $G\alpha$ y $G\beta$ convergen en un mismo efector o si participan en vías diferentes. Para esto es indispensable conocer el papel de la proteína cinasa KISTe20p y determinar su probable interacción con las proteínas $G\alpha$ (KIGpa1p) y $G\beta$ (KISTe4p).

3. HIPÓTESIS

Los análisis de la secuencia de KISTe20p predicen dominios de interacción con la subunidad $G\beta$ (KISTe4p) de *K. lactis*, por lo que, pensamos que KISTe20p participa en la vía de respuesta a feromonas y es efector de esta subunidad. Esto implica que la vía que activa $G\alpha$ es independiente y no se espera interacción directa entre KISTe20p y KIGpa1.

4. OBJETIVO GENERAL

- ☞ Determinar la participación de KISTe20p en la vía de respuesta a feromonas en *Kluyveromyces lactis*

Objetivos Particulares

- ☞ Realizar la interrupción del gen *KISTE20* y analizar el fenotipo de una mutante $\Delta Kiste20$
- ☞ Medir la interacción de KISTe20p con la proteína G heterotrimérica de *K. lactis*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas

La cepa EGY48 (*MAT α* , *trp1*, *his3*, *ura3*, *leu2::pLeu-LexAop6*) de *S. cerevisiae* se utilizó para las transfecciones con los plásmidos del doble híbrido. La cepas 155 (*MAT α* , *ade2*, *his3 ura3*) y 12/8 (*MAT α* , *argA*, *lysA*, *uraA*) de *K. lactis* se transfectaron con el plásmido utilizado para generar las mutantes $\Delta ste20::URA3$.

Escherichia coli DH5 α se utilizó para propagar las construcciones realizadas en los plásmidos que tienen un marcador de resistencia a ampicilina.

E. coli Gm33⁻ es una cepa metilasa negativa utilizada para propagar plásmidos en los cuales se utilizaron enzimas sensibles a metilación.

5.1.1. Medios de cultivo para levaduras y bacterias

El YPD consiste de extracto de levadura al 1%, bactopectona 2% y glucosa 2%. EL Medio mínimo (SD) está compuesto de base nitrogenada de levadura al 0.65% sin aminoácidos (DIFCO) y glucosa 2%. El medio de Sgal utiliza lo mismo que el medio mínimo pero se sustituye la glucosa por galactosa. Los medios SD y SGal se complementan con los aminoácidos requeridos (50 μ g / ml) para seleccionar las levaduras que tienen plásmidos con algún marcador de auxotrofia. El medio LB adicionado con 50 μ g/ml de ampicilina fue utilizado para el crecimiento de bacterias recombinantes.

5.1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron:

El YIp352 que es un plásmido de integración, puede replicarse autónomamente en levaduras y bacterias (Hill *et al.*, 1986), se utilizó para interrumpir el gen *KISTE20*.

El pEG202 y pJG4-5 son plásmidos utilizados para los ensayos de doble híbrido, y ambos tiene marcadores de selección en levaduras y bacterias. El pEG202 tiene un dominio de unión a DNA (DBD) en la proteína *lexA*. El pJG4-5 tiene una secuencia de localización nuclear y el dominio de activación de la transcripción (AD).

El pSH18-34 es un plasmido de replicación autónoma con 8 operadores que dirigen la transcripción del gen *lacZ* y se utiliza como reportero.

5.2. Amplificación de gen *KISTE20* por PCR

A partir del DNA genómico extraído de la cepa 155 de *K. lactis* se realizaron dos amplificaciones por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen *KISTE20* se amplificó utilizando oligodeoxinucleótidos dirigidos contra las secuencias no traducidas del locus *KISTE20*: 5'TTTGTCTCCTCGAGATGACGGATACTGGAT 3' el cual tiene un sitio de restricción *XhoI* y se encuentra de la posición -14 a +16 y 5'TAAATTCATGTACTCTGCAGTAAAACAGAAAT 3', el cual tiene un sitio de restricción *PstI* y está en la posición +2972 a +3001. Se amplificó el extremo amino terminal del gen *KISTE20* utilizando los siguientes oligonucleótidos 5'TTTGTCTCCTCGAGATGACGGATACTGGAT 3' el cual tiene un sitio de restricción *XhoI* en la posición -14 a +16 y 5' TGCGGTTAGGATTTCCGAGCTCCTTTAAAT 3' en el cual se inserto un codón de termino en la posición +2732 y un sitio *XhoI* en la posición +2740. La secuencia del gen fue obtenida de un banco de datos del genoma de *Kluyveromyces lactis* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php>)

Las condiciones de PCR fueron las siguientes. desnaturalización 5 minutos a 95° C, elongación 50 ciclos de 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 45° C, 3 minutos 30 segundos a 72° C y la extensión final de 10 minutos a 72° C.

Para amplificar el gen completo se utilizó Platinum Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) y el fragmento del N-terminal se amplificó con la enzima TaKaRa LA Taq.

5.3. Manipulación de DNA

Se utilizaron procedimientos ya descritos (Sambrook *et al.*, 1989) para manipulación de DNA recombinante. Los deoxioligonucleótidos fueron sintetizados automáticamente utilizando un sintetizador Applied Biosystems DNA.

5.4. Clonación y secuenciación del gen *KISTE20*

Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR; del ORF de *KISTE20* y del extremo N-terminal para verificar el peso molecular de cada uno de los fragmentos posteriormente se clonaron en el vector pCR®4Blunt-TOPO® (Invitrogen) y en el vector pGEM®-T Easy (Promega®), respectivamente, de acuerdo las indicaciones del proveedor. Se enviaron a secuenciar para verificar que no tuvieran mutaciones que pudieran alterar el gen.

5.5. Construcciones de *KISTE20*

5.5.1. Interrupción del gen *KISTE20*

Yip352-KISTE20: Se clonó un fragmento de 1kb en el vector de integración para levadura Yip352 en los sitios *Sall* y *EcoRI*. Esta construcción se linearizó utilizando la enzima de restricción *BglII* que genera extremos de recombinación de 268 pb en el extremo 5' y de 779 hacia el extremo 3'. Se transformaron las cepas *MATa* (12/8) y *MAT α* (155).

5.5.2 Construcciones para ensayos de doble híbrido

El gen *KISTE20* se clonó en los sitios *XhoI* del vector pEG202 y pJG4-5.

Construcción pEG202–N-terminal: El fragmento que correspondía al extremo amino terminal se clonó en los sitios *XhoI* del vector pEG202.

Construcción pEG202-COOHKISte20: Para realizar esta fusión se utilizó la construcción del Yip352-*KISTE20* con la cual se transformó la cepa GM33- (ver cepas). Posteriormente, el plásmido se purificó y se digirió con la enzima *BclI* y *Sall*; este fragmento de 342 pb se subclonó en los sitios *BamHI* y *Sall* del vector pEG202.

Las construcciones se enviaron a secuenciar para verificar que los genes estuvieran fusionados en marco de lectura correcto.

5.6. Transformación de *Escherichia coli*

Se generaron bacterias competentes de *E. coli* utilizando el método de transformación de alta eficiencia (Inoue *et al.*, 1990). La cepa DH5 α se

transformó con las construcciones: TOPO-*KISTE20*, pGEM-N-terminal, YIp352-*KISTE20*, pEG202-*KISTE20*, pJG4-5-*KISTE20*, pEG202-COOHKISte20.

5.7. Transformación en levaduras

La transformación en levaduras se llevó acabo utilizando el método de LiOAc / PEG / DMSO (Gietz *et al.*, 2001). Las células transformadas se sembraron en los medios correspondientes SD-ura para interrupcion del gen y Sgal para transformaciones de doble híbrido.

5.8. Purificación de ácidos nucleicos

La purificación de plásmidos de *E. coli* se realizó utilizando el protocolo de QIAprep®Spin miniprep (Quiagen ®) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los plásmidos para el análisis con endonucleasas de restricción se obtuvieron con la técnica de extracción de 10 minutos “TENS-Minipreps”. (Lench *et al.*, 1987)

La extracción de DNA genómico se realizó utilizando la técnica de QTP (Hoffman *et al.*, 1993)

Se utilizó el protocolo básico de preparación de RNA de levaduras por extracción con fenol ácido caliente (Ausubel *et al.*, 1996).

El procedimiento para la purificación de fragmentos de gel se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Geneclean, BIO101®).

5.9. Hibridaciones tipo Southern blot y Northern blot

El DNA genómico obtenido de las cepas mutantes y silvestres de *K. lactis* se digirió con la enzima de restricción *BstEII* las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% posteriormente el gel se desnaturalizó 30 min en una solución de NaOH 0.5 N, NaCl 1.5M y se neutralizó 30 min con Tris 1M pH 7.5, NaCl 1.5M.

Se obtuvo RNA total de las cepas mutantes y silvestres y 15µg de RNA fue separado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes con formaldehído en gel de agarosa al 1%.

Cada gel fue transferido a una membrana de nylon (Amersham®) por capilaridad como describe Sambrook *et al.*, 1989.

La hibridación para DNA se realizó utilizando como sonda un fragmento de 1Kb *EcoRI* – *XhoI*. Para RNA se utilizó como sonda un fragmento *NcoI* – *XbaI* de 0.68 kb.

Ambas sondas se marcaron con [³²P] αdCTP siguiendo el protocolo de Ridiprime II (Amersham®).

La hibridación se realizó a 55°C toda la noche y los lavados se realizaron 3 veces con una solución de SSC 1x (NaCl 0.15M y Citrato de Sodio 0.015M) y SDS 0.1% (Dodecil Sulfato de Sodio). Todos los lavados se realizaron a 60°C por 10 minutos.

5.10. Ensayos de apareamiento

Se hicieron parches de la cepa mutante sobre medio selectivo (SD-ura) y la cepa silvestre se plaqueo en un medio rico. Ambas se incubaron durante 48h a 30°C. Posteriormente se replicaron en terciopelos y se recuperaron en medio rico (YPD) para que se llevara a cabo el apareamiento a 30°C durante 5h, después de este tiempo por replicación se pasaron a una caja de medio mínimo (SD) y se incubaron a 30°C durante 48h para recuperar solo las células diploides.

5.11. Ensayos de interacción proteína – proteína.

El fragmento que codifica para el gen *KISTE20* se obtuvo por PCR introduciendo sitios de restricción *XhoI* en la posición –6 y +2981.

Los productos de PCR inicialmente se clonaron en pCRII y se subclonaron en pEG202 digerido con la misma enzima. Los genes *KIGPA1* y *KISTE4* se subclonaron en pJG4-5 en los sitios *EcoRI* – *XhoI* obtenidos por amplificación (Ongay-Larios *et al.*, 2000).

El gen *KISTE11* se obtuvo por PCR y posteriormente, se subclonó en los plásmidos del doble híbrido pEG202 y pJG4-5 (datos no publicados). Esta construcción se realizó con el fin de conocer su interacción con KISTe20p y además con el modulo de MAPKs.

El gen de endoquitinasa de *S. cerevisiae* (*Cts1-2*) amplificado por PCR fue subclonado en pEG202 para utilizarlo como control negativo de interacción (Ongay-Larios *et al.*, 2000).

La cepa EGY48 se transfectó con las construcciones realizadas y las transformantes se plaquearon en SD (medio mínimo) para seleccionar los plásmidos. Posteriormente, se transfirieron en medio con galactosa (inducción) y sin LEU a 30°C por 48 horas para inducir la expresión de proteínas fusionadas a AD y seleccionar las colonias que expresan las proteínas híbridas. La interacción se determinó por la capacidad de proteínas recombinantes de complementar la auxotrofia de leucina y de inducir la expresión del gen reportero *LacZ*, localizado en el plásmido pSH18.

Las transformantes *LEU+* se probaron añadiendo X-gal al medio de galactosa para ver la expresión del reportero *LacZ*.

5.12. Ensayos de β -galactosidasa

Se determinaron de acuerdo a Miller, 1972. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de ortho-nitrofenol de orto-nitrofenil- β -galactipiranosido (ONPG) por minuto bajo las condiciones del ensayo. Unidades expresadas por ml de medio de cultivo.

6. RESULTADOS

6.1. Clonación y secuenciación del gen *KISTE20*

La clonación del gen que codifica para KISTe20p se llevó a cabo por la técnica de PCR. El producto de PCR obtenido por amplificación del DNA genómico fue de 2.9 kb (Figura 8). Posteriormente, se realizó una búsqueda en el genoma de *K. lactis* para saber si había otra secuencia con un porcentaje de similitud parecido y se encontró un homólogo a KISTe20p, KICla4p que presenta un 31.6% de identidad, sin embargo, en esta cinasa no se identificó el dominio de unión a G β lo que sugiere que no puede unirse a esta subunidad y por lo tanto no participa en la vía de respuesta a feromonas de apareamiento.

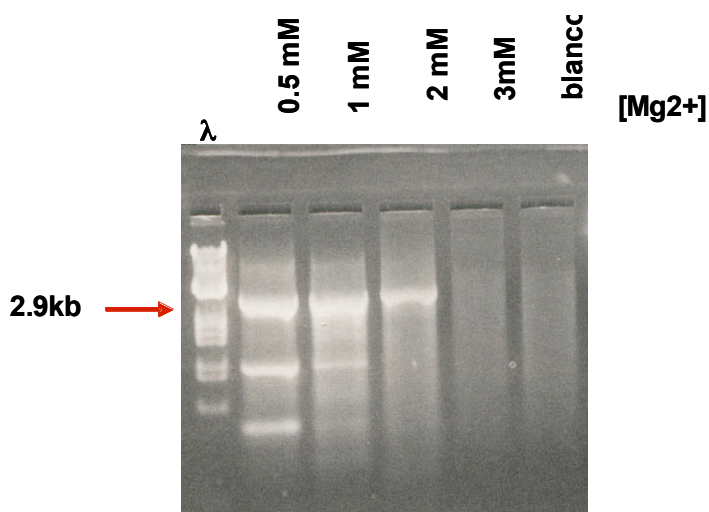


Figura 8. Amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos contra las secuencias 5' y 3' no traducidas del locus *KISTE20*.

6.2. Análisis de la secuencia de *KISTE20*

Después de que se obtuvo la amplificación del gen *KISTE20*, este se secuenció y el análisis de la secuencia predice que es un gen de 2967pb incluyendo el codón de termino (Figura 8) y codifica para una proteína de 989 aa (Figura 9) con un peso molecular calculado de 108.9 kDa.

KISTE20 se comparó con el gen *ScSTE20* realizando un alineamiento con el programa Water (<http://132.248.16.25/EMBOSS/>) y presenta 50% de identidad y 61.5 % de similitud con su proteína homóloga.

El análisis de la secuencia nos indica que en KISte20p se encuentran conservados los dominios de unión a proteínas como Cdc42p, Bem1p y a la subunidad G β de la proteína G. La región que corresponde al extremo N-terminal KISte20p (1 - 704) presenta un 35.9% de identidad con su homólogo en *S. cerevisiae*, mientras que la secuencia que corresponde al C-terminal (705 – 989) se encuentra mas conservada con un 81.6% de identidad (Figura 9a).

En KISte20p se identificaron residuos de aminoácidos (401 - 443) que en su homologo *S. cerevisiae* están involucrados en la asociación con la GTPasa Cdc42p. Otra secuencia que se identificó es el dominio de unión a la proteína Bem1p (537 – 565). En el extremo carboxilo terminal (955 – 971) (Figura 9a) KISte20p contiene residuos que en *ScSte20p* están involucrados en la asociación con la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica (Figura 9a y b).

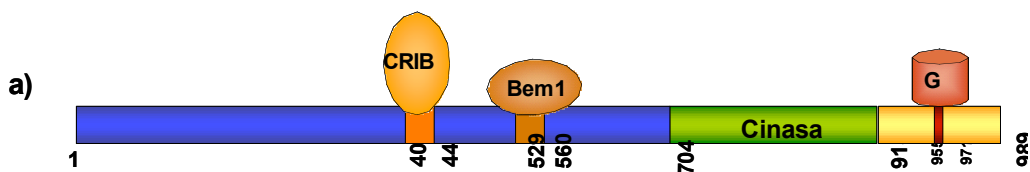


Figura 9. a) Mapa físico de KISte20p. Presenta tres dominios que han sido descritos en su homólogo *ScSte20* de *S. cerevisiae*. En azul se muestra el fragmento que corresponde al amino terminal en donde se encuentra el dominio de unión a Cdc42 (naranja), en verde lo que corresponde al dominio cinasa y que se localiza en el extremo carboxilo terminal (amarillo), en donde está el dominio de unión a G β (rojo).

6.3. INTERRUPCION DEL GEN *KISTE20*

En otros hongos se ha reportado que la cinasa Ste20p es importante en la vía de respuesta a feromonas. Para conocer si KISTe20p desempeñaba alguna función en la vía de apareamiento de *K. lactis* se generó una mutante por recombinación homóloga utilizando una construcción Yip352-KISTe20 *EcoRI* / *Sall* que se obtuvo en las cepas de ambos sexos, *K. lactis* 155 (*MAT α* , *ade2*, *his3*, *uraA*) y *K. lactis* 12/8 (*MAT α* , *argA*, *lysA*, *uraA*).

El plásmido linearizado se obtuvo por digestión con la enzima *Bgl*II (Figura 10a) y se utilizó para transfectar las cepas haploides que se seleccionaron en SD-ura. Para verificar que el gen estuviera interrumpido se tomaron 3 colonias de cada tipo celular para realizar análisis tipo Southern blot con el DNA genómico de las posibles cepas mutantes así como de las silvestres. El DNA se digirió con la enzima *Bst*EII y posteriormente, se realizó la hibridación utilizando como sonda un fragmento *EcoRI*-*Xho*I de 1Kb (Figura 10a).

En la cepa silvestre se observó una banda de 4.8 Kb que correspondía al peso esperado y en las mutantes se identificó una banda de 8.4 Kb que correspondía al peso molecular esperado en las cepas que ocurrió el evento de inserción del cassette de uracilo por un evento de recombinación doble. (Figura 10a y b).

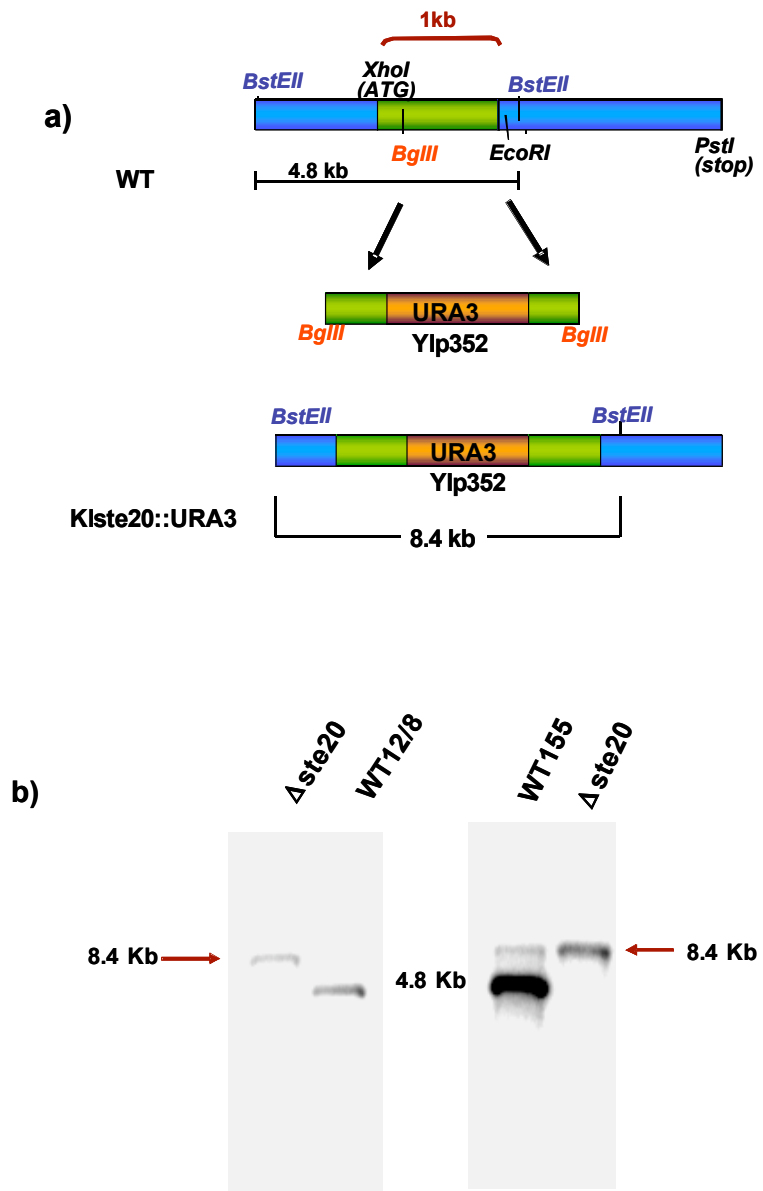


Figura 10 a) Esquema de la interrupción de *KISTE20*. donde se muestran las enzimas de restricción utilizadas y los pesos esperados tanto en las cepas silvestres como en las mutantes. La sonda para el southern fue el fragmento de 1kb (verde). b) Southern blot de las cepas silvestres y mutantes.

6.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE KISTE20p

Después de comprobar que el gen *KISTE20* estaba interrumpido (Figura 10b) se realizó una hibridación tipo Northern blot a las cepas de ambos sexos para saber si había síntesis de RNA mensajero.

Para realizar este ensayo se obtuvo RNA total de las cepas silvestres así como de las mutantes $\Delta Kiste20::URA$. La sonda utilizada fue un fragmento *NcoI* – *XbaI* de 680 pb. En este análisis se observó que en las cepas que tienen el gen interrumpido por la inserción del casete *URA3* no hay transcripción del RNA mensajero (Figura 11)

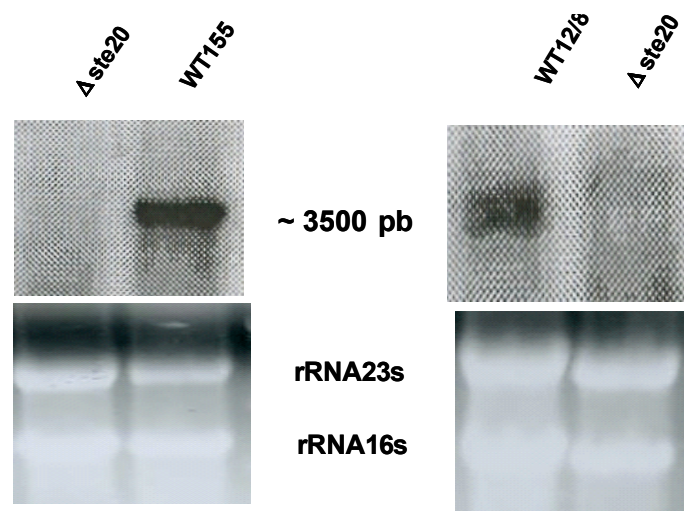


Figura 11. Northern blot de las cepas mutantes $\Delta Kiste20::URA3$ y silvestres.

6.5. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE UNA CEPA $\Delta ste20::URA3$.

Después de verificar que no había producción de mRNA de KISTe20p se realizaron ensayos para conocer cual era la función de esta proteína en la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis*. Para realizar los ensayos de apareamiento se hicieron parches de las cepas mutantes $\Delta ste20::URA3$ de ambos sexos y se plaquearon los céspedes de las cepas silvestres. Se replicaron por terciopelo, la mutante *MATa* con la silvestre *MAT α* y de igual forma con el sexo contrario. Las células se recuperaron en medio rico y posteriormente, se replicaron a medio mínimo para seleccionar a los diploides. El resultado obtenido fue un fenotipo de esterilidad total; lo cual indica que KISTe20p participa en la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis* y además es una proteína muy importante ya que la interrupción en este gen impide que la célula pueda aparearse (Figura 12).

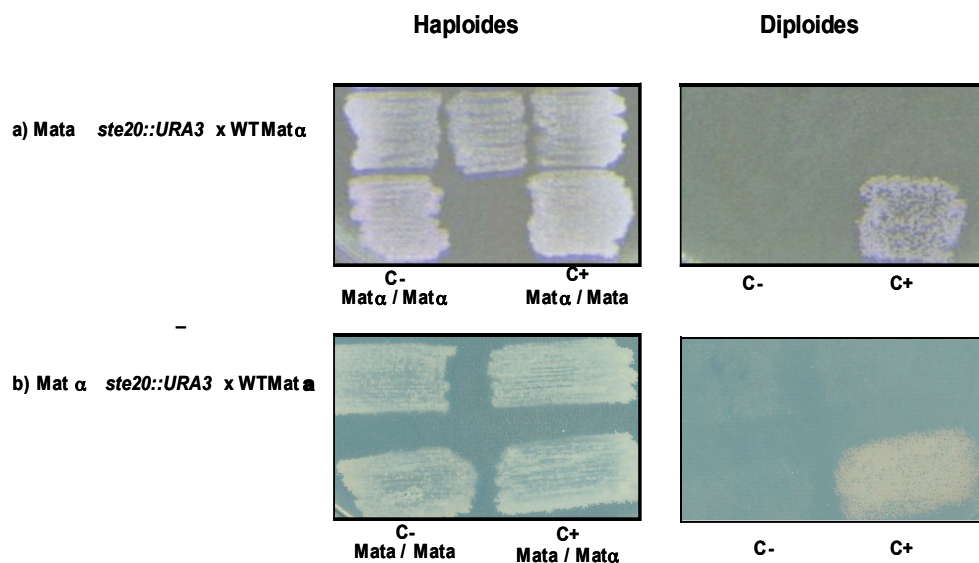


Figura 12. Efecto de la interrupción de *KISTE20* en el apareamiento de las células. a) *MATa* y b) *MAT α* . A la izquierda se muestran los parches de las haploides $\Delta KISTe20::URA3$ tanto de las células *MATa* (panel superior) como de las *MAT α* (panel inferior).

6.6 La técnica del doble híbrido.

El sistema de LexA – B42 es similar al de *GAL4*, utiliza un dominio de activación y una proteína de unión a DNA que son completamente heterólogas a levaduras (Fields *et al.*, 1989).

Permite el uso del promotor inducible *GAL1* para expresar las proteínas fusionadas, la expresión inducible significa que hay menor probabilidad de que proteínas de fusión extrañas intervengan en el sistema. Utiliza como reportero el gen *LacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa en un plásmido de replicación autónoma (pSH18). El alto número de copias del plásmido reportero y sus múltiples operadores de LexA amplifican efectivamente las señales débiles y hacen posible ver la actividad de β -galactosidasa en un cultivo en placa añadiendo X-gal y detectando por coloración azul las colonias positivas.

El ensayo de doble híbrido es realizado *in vivo* y las proteínas pueden estar en su conformación nativa, lo cual incrementa su sensibilidad. Es un ensayo de interacción que se lleva a cabo en el núcleo de la levadura y las proteínas se encuentran a altas concentraciones ya que están fusionadas en plásmidos de alto número de copias. El ensayo de doble híbrido utiliza la propiedad de muchos activadores transcripcionales de separarse física y funcionalmente en un dominio de unión a DNA (DBD) que se une a una secuencia promotora específica y un dominio de activación de la transcripción (AD) que dirige a la RNA pol II y todos los factores para transcribir el gen que se encuentra río abajo del DBD. Entonces esos 2 dominios se traen en proximidad a la región promotora; AD puede unirse con DBD y activar la transcripción (Figura 7) (Coates *et al.*, 2003).

El DBD lo proporciona la proteína *LexA* de bacteria, la cual funciona normalmente como un represor en *E. coli* cuando se une a los operadores de *LexA* (pero en este sistema no actúa como represor). AD es un péptido heterólogo de 88 aminoácidos ácidos que activa la transcripción en levaduras. Una interacción entre la proteína unida a DBD y la unida a AD forma un nuevo activador transcripcional con alta afinidad por los operadores de LexA.

La cepa utilizada es la EGY48 la cual es transfectada con los tres plásmidos, esta cepa tiene integrado el gen reportero *LEU2* y ambos *LEU2* y *lacZ* están bajo el control de los operadores de *lexA*.

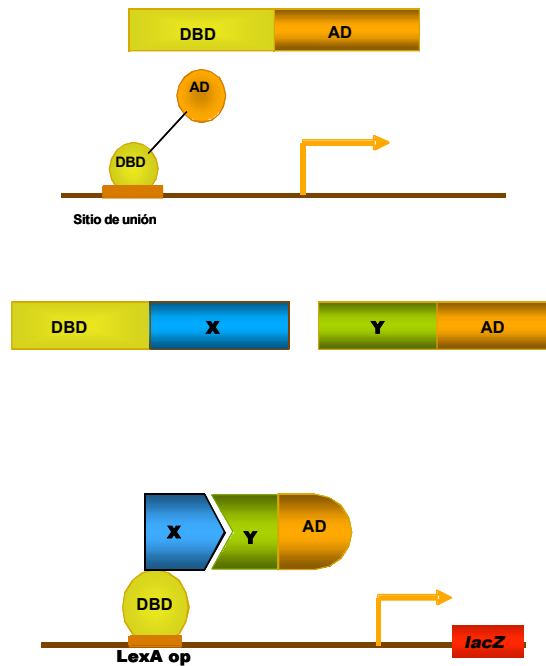


Figura 7. Esquema del sistema de doble híbrido que permite identificar una interacción proteína – proteína mediante la actividad transcripcional. La interacción entre las dos proteínas X y Y conducen a la reconstitución de un activador transcripcional y por lo tanto se puede activar la transcripción del gen reportero *lacZ*.

6.6.1 Construcciones para medir la interacción de K1Ste20p con los componentes del sistema de respuesta a feromonas

Después de que se comprobó que K1Ste20p es esencial en la vía de respuesta a feromonas se realizaron ensayos de interacción genética para saber si K1Ste20p podría ser un posible efector de la proteína G heterotrimérica. Para llevar a cabo este experimento se realizaron diferentes construcciones de los genes fusionados al dominio de activación de la transcripción (AD) y al dominio de unión a DNA (DBD) (Figura 13).

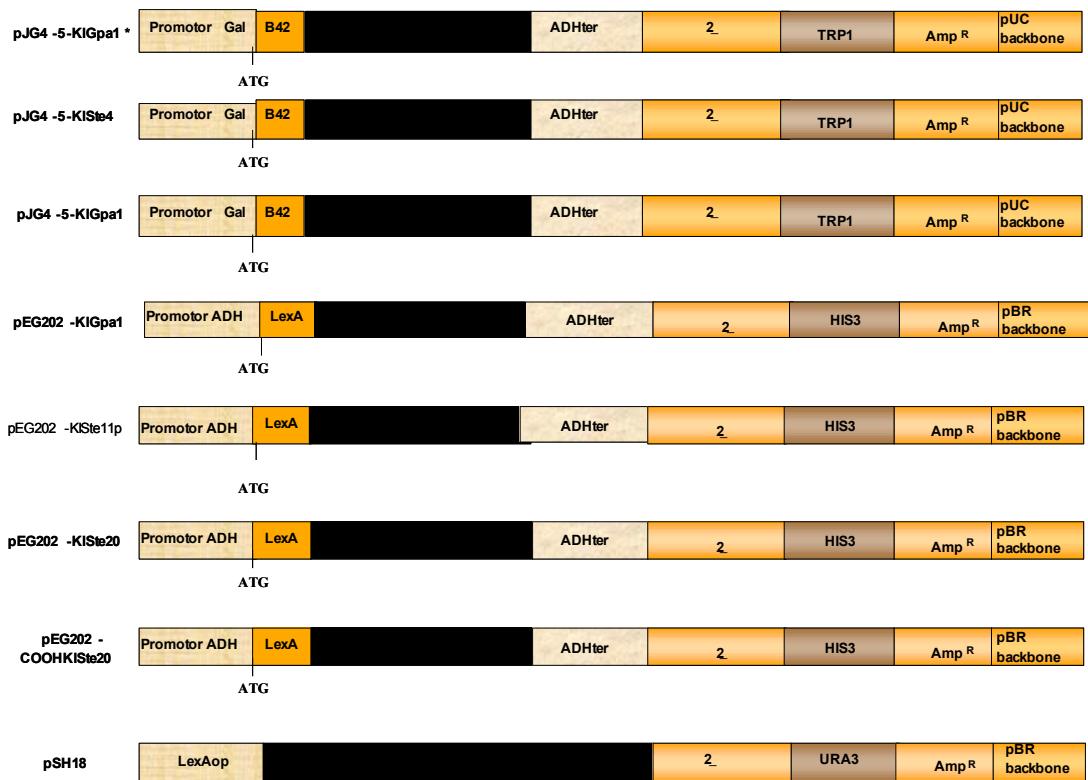


Figura 13. Construcciones utilizadas para realizar los ensayos de doble hibrido. Cada una de las proteínas fue fusionada con el DBD (LexA) o AD (B42).

En el laboratorio ya se había caracterizado la interacción entre $G\alpha$ y $G\beta$ la cual se utilizó como control positivo y como control negativo se utilizó el gen de la endoquitinasa (CST1-2) que se sabe no participa en la vía de respuesta a feromonas (Ongay-Larios *et al.*, 2000).

6.6.2. Interacción entre KIS_{te}20p y el COOH-KIS_{te}20p con la subunidad G β de la proteína G.

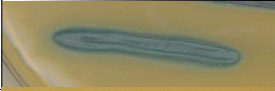


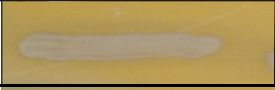
En *S. cerevisiae* ScSte20p actúa como uno de los efectores de la subunidad G β a la cual se une a través de un dominio que se localiza en el extremo carboxilo terminal (Leeuw *et al.*, 1998). En KIS_{te}20p se identificó esta secuencia y está altamente conservada, lo cual sugiere que KIS_{te}20p puede interactuar y ser un posible efector de la subunidad KIG β en *K. lactis*. Para verificar esta hipótesis se realizaron ensayos de interacción genética utilizando el sistema del doble híbrido.

En el laboratorio ya se había realizado la construcción del gen *KISTE4* que codifica para la subunidad G β de la proteína G; esta se realizó subclonando el gen *KISTE4* en el vector pJG4-5 fusionado en marco de lectura con el dominio de activación de la transcripción B42 el cual se expresa bajo el control del promotor inducible GAL1 (Figura 13).

El gen *KISTE20* fue subclonado en el vector pEG202 fusionado con el dominio de unión a DNA *LexA*, colocando a la proteína híbrida bajo el control del promotor constitutivo *Adh1*. De igual manera se realizó la subclonación que fragmento del gen que correspondía al COOHKIS_{te}20p que es la región en la cual se encuentra el dominio de unión a la subunidad G β (Figura 13).

Los ensayos de doble híbrido detectaron que KIS_{te}20p se asocia a la subunidad G β y que el carboxilo terminal es suficiente para que se lleve a cabo esta interacción (Figura 14 a y b).

a

Proteínas	β - gal (cualitativo)	Crecimiento en - LEU
KIGpa1 - KISte4p		++++
KISte4p - KISte20p		+++
KISte4p - KICOOHSte20p		+++
KISte20p - Echi		-

b

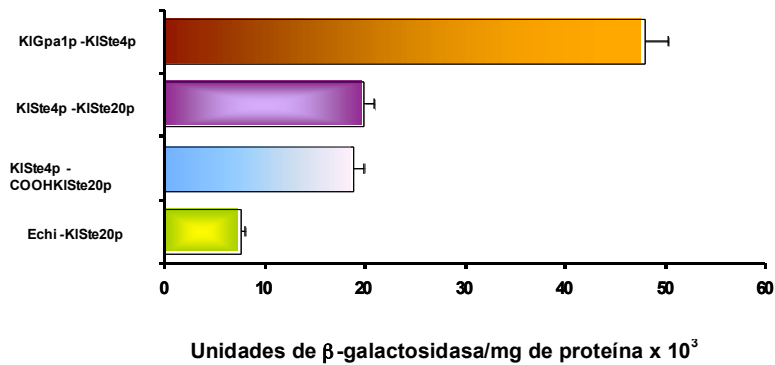


Figura 14. Ensayos de interacción proteína-proteína: se realizaron experimentos cualitativos y cuantitativos mediante el sistema del doble híbrido. a) Ensayos de interacción cualitativos entre KISte20p(ORF), COOHKISte20p y KISte4p. b) Actividad de β -galactosidasa (unidades /mg proteína $\times 10^{-3}$) entre la asociación de KISte20p así como del extremo carboxilo terminal con la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica. Las barras indican el error estándar.

6.6.3. Interacción de KISte20 con la subunidad G α de la proteína G.

En *K. lactis* se ha encontrado que a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* tanto la subunidad G β (Kawasaki *et al.*, 2005) como la subunidad G α (Saviñon-Tejeda *et al.*, 2001) transducen la señal de la feromona por lo que ambas proteínas activan efectores. Se realizaron ensayos de interacción genética para saber si KISte20p podía ser un efector de KIGpa1. Con la construcción pEG202 – KISte20p y en el laboratorio ya se tenía la construcción de pJG4-5 de la subunidad G α en forma activa (pJG4-5-KIGpa1) así como en su forma inactiva (pJG4-5-Gpa1*) (datos no publicados). Se realizaron ensayos de doble híbrido para saber si estas proteínas interactuaban y los resultados obtenidos fueron que KISte20p interactúa con la subunidad G α de la proteína G y además esta interacción ocurre de manera diferencial entre la forma activa e inactiva; siendo mas fuerte la interacción con la forma inactiva que con la forma activa (Figura 15 a y b).

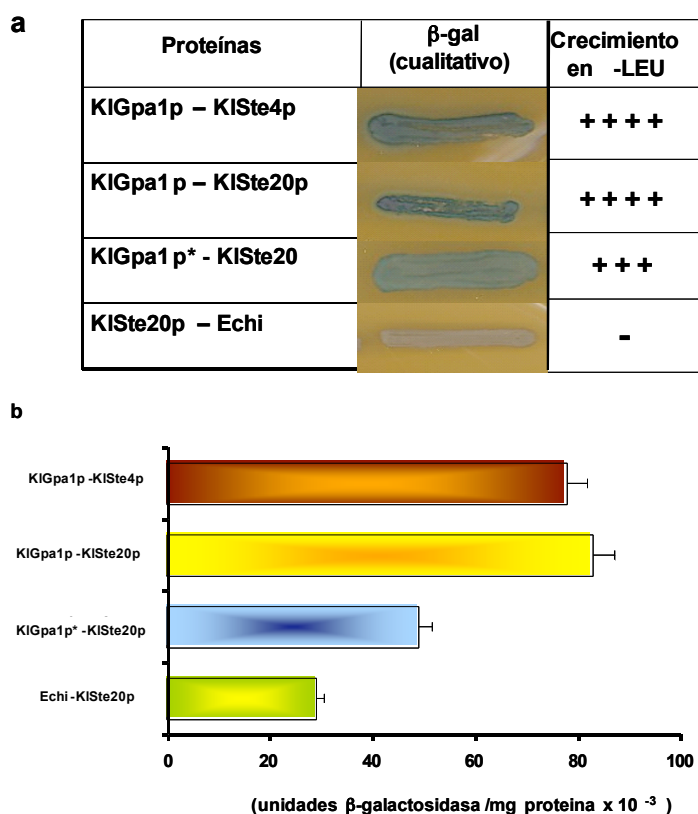


Figura 15. a) La interacción cualitativa de las proteínas híbridas. b) Actividad de β -galactosidasa (unidades/mg proteina x 10⁻³) de la interacción entre KISte20p y la subunidad G α tanto en su forma activa como inactiva.

6.6.4. Interacción entre KISTe20p y la MEK cinasa KISTe11p.

En otros hongos se ha encontrado que Ste11p es el primer componente del modulo de MAPKs y que esta proteína es activada a través de su interacción con Ste20p (van Drogen, 2000). Sin embargo, en *K. lactis* no se sabe como es que se activa el módulo de MAPKs por lo cual se realizaron ensayos para saber si había interacción entre KISTe20p y KISTe11p. Se utilizó la construcción que contenía el gen completo *KISTE20* fusionado al dominio de unión a DNA (pEG202- KISTe20p) y el gen *KISTE11p* se fusionó con el dominio de activación de la transcripción (datos no publicados); posteriormente, se realizaron ensayos de interacción cualitativa y los resultados indican que hay unión entre KISTe20p y KISTe11p pero esta interacción es débil (Tabla 2).

Tabla 2. Interacción cualitativa entre KISTe20p y KISTe11p

Proteínas	B-gal (cualitativo)	Crecimiento en - LEU
KIGpa1p -KISTe4p	+ + +	+ + +
KISTe20p -KISTe11p	+	+
KISTe20p -Echi	-	-

7. DISCUSIÓN

El control de los estímulos intracelulares y extracelulares en la proliferación y cambios morfológicos, son elementos importantes que regulan el desarrollo de los organismos eucariontes. Las vías de transducción de señales están involucradas en detectar esas señales en la membrana plasmática, transmitir las al citoplasma y después al núcleo para generar cambios apropiados en el metabolismo y la transcripción de genes. Muchas de las señales son transducidas por MAPK o proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) las cuales se activan por fosforilación y están altamente conservadas en todos los organismos eucariontes (Bardwell *et al.*, 1994).

En *S. cerevisiae* se han descrito 5 módulos de MAPKs (Qi *et al.*, 2005) los cuales intervienen en respuestas celulares durante el apareamiento y esporulación lo que permite a la célula adaptarse rápidamente a cambios en el ambiente como son los diferentes tipos de estrés y cambios en las condiciones nutricionales. En el apareamiento las feromonas se unen a receptores de 7 dominios transmembranales que conduce a la disociación de la proteína G heterotrimérica, permitiendo que el dímero $G\beta\gamma$ interactúe con sus efectores Ste5p y Ste20p. Ste5p es requerido para transducir la señal ya que interactúa con el módulo de MAPKs; Ste11p, Ste7p y Fus3p, desempeñando una función de proteína adaptadora. En el núcleo Fus3p fosforila al factor de transcripción Ste12 (Bardwell *et al.*, 1994).

Los componentes de la vía de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* se han identificado y caracterizado, sin embargo, hay otras levaduras en las cuales se han realizado estudios encaminados a conocer como se transduce la señal producida por la secreción de feromonas. *K. lactis* está estrechamente relacionada con *S. cerevisiae*, sin embargo, de acuerdo a experimentos realizados en el laboratorio se ha encontrado que algunos componentes de la vía de señalización para el apareamiento presentan algunas diferencias (Coria *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *S. cerevisiae* Gpa1p desempeña un papel negativo ya que la falta de esta proteína es letal porque se produce la interrupción del ciclo celular en la fase G1 y las células tienen una capacidad

transitoria de aparearse. En *K. lactis* en cambio la subunidad G α desempeña un papel positivo ya que una mutante de *KIGPA1* tiene un apareamiento deficiente (de hasta el 20%) y las células haploides son viables (Saviñon-Tejeda *et al.*, 2001). El papel positivo de KIGpa1p sugiere que hay efectores que son activados por esta subunidad independientemente de los que son activados por la vía del dímero G $\beta\gamma$ (Figura 3).

En *S. cerevisiae* G $\beta\gamma$ tiene diferentes efectores; Ste5p, Ste20p y Far1p. Ste5 y Ste20 participan en la vía de respuesta a feromonas (Peter *et al.*, 1996; Dowell *et al.*, 1998). En *K. lactis* no se sabe cuales son los efectores de la proteína G heterotrimérica para activar al modulo de MAPKs (Figura 2).

Con la hipótesis de que en *K. lactis* existe una proteína efectora de G β se realizó una búsqueda, identificándose una secuencia que codifica para una posible proteína cinasa de la familia PAK / Ste20p. Esta presenta un 50% de identidad con su homóloga en *S. cerevisiae*. KISTe20p es proteína de 989 residuos de aminoácidos (50 aminoácidos más grande que Ste20p de *S. cerevisiae*) está dividida en un extremo N-terminal regulatorio y un extremo C-terminal que presentan un 35.9% y 81.6% de identidad con ScSte20p.

Se realizó una búsqueda (blast) en el genoma de *K. lactis* para saber si había otro gen parecido a *KISTE20* y encontramos una secuencia que presenta un 31.6 % de identidad con KISTe20p, es la cinasa KICla4p que tiene un dominio de homología a pleckstrina pero no tiene el dominio GBB, lo que sugiere que no participa en la respuesta a feromonas de apareamiento. En *S. cerevisiae* se observó que Cla4p es incapaz de recuperar la función de Ste20p en la vía de respuesta a feromonas en una cepa que tiene mutado el gen (Keniry *et al.*, 2003).

En el análisis de la secuencia de KISTe20p se encontró que en el fragmento que corresponde al N-terminal están presentes dos dominios de interacción que están altamente conservados en la familia de proteínas PAK/Ste20p; un dominio de unión a Cdc42p (CRIB) FKISTPYNAKHIHHVGVD entre los aminoácidos 401 a 443 (Figura 9) y un dominio de unión a Bem1p rico en

prolinas entre los aminoácidos 529 a 560 (Figura 9). De acuerdo a los reportes que indican que Ste20p participa en otras vías de señalización (Gustin *et al.*, 1998), los dominios que se identificaron en KSte20p sugieren que esta proteína puede participar también en otras rutas y que las interacciones con otras proteínas pueden contribuir a la especificidad en la transmisión de la señal en las diferentes vías.

En el C-terminal de KSte20p entre los aminoácidos 704 a 913, está localizado el dominio cinasa y un posible dominio de unión a la subunidad G β de la proteína G heterotrimérica. Este dominio está presente en miembros de la familia PAK / Ste20p y está conservado desde hongos hasta mamíferos (Leeuw *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001) (Figura 9). Este dominio de unión a G β que contiene los aminoácidos **EENTSLAPLVKLARMKK**, tiene la particularidad de ser una región constituida por residuos polares (negritas) alternados con algunos aminoácidos no polares. De acuerdo a lo que se ha reportado en diferentes estudios de interacción proteína-proteína (Glaser *et al.*, 2001) (Figura 6a y b) la presencia de aminoácidos polares y el tamaño pequeño de la superficie de contacto nos sugiere que la región de interacción entre KIG β y KSte20p puede ser transitoria. La región de interacción de KSte20p con KIG β se encuentra en el extremo C-terminal. Nuestros datos indican que este dominio el cual contiene la secuencia descrita es suficiente para mediar la interacción con G β (Figura 14a y b). Esto sugiere que la región del N-terminal no hace contacto con la subunidad G β y está libre para interactuar con otros elementos.

En este trabajo se analizó cual era la función de KSte20p en la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*. Con base en el análisis de la secuencia se sabe que KSte20p es homólogo a ScSte20, sin embargo, encontramos que hay algunas diferencias funcionales entre estas dos proteínas. Se generó una mutante de KSte20p. La interrupción del gen *KISTE20* fue verificada por análisis de tipo Southern y Northern blot en donde se observó que en las cepas mutantes que tienen insertado el casete de URA3 ($\Delta ste20::URA3$) no había producción del mensajero que codifica para KSte20p y por ensayos de apareamiento realizados en placa, el fenotipo observado es que las células

$\Delta ste20::URA3$ son totalmente estériles a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* en donde una mutante de este gen ocasiona una disminución en el apareamiento pero no esterilidad total (Leberer *et al.*, 1992; Ramer *et al.*, 1993). Esto se puede deber a que se ha demostrado que Ste5p también es efector de la subunidad $G\beta$ por lo que esta proteína puede activar el módulo de MAP cinasas para la transcripción de genes requeridos en el apareamiento (Dowell *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en *K. lactis* K1Ste20p es el principal efector de la subunidad $G\beta$.

Las proteínas cinasas son mediadores de muchas señales iniciadas por receptores acoplados a proteínas G heterotrimérica, los mecanismos de activación de las cinasas son diversos. En levaduras la proteína G heterotrimérica regula a miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por p-21 (PAKs). En *S. cerevisiae* Ste20 es estimulado por el dímero $G\beta\gamma$ (Ste4/Ste18) en respuesta a feromonas y en *Schizosaccharomyces pombe* la subunidad $G\alpha$ (Gpa1) es el transductor de la señal a Shk1p el homólogo a Ste20 de *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente tanto la subunidad $G\beta$ (Kawasaki, *et al.*, 2005) como la subunidad $G\alpha$ (Saviñon-Tejeda *et al.* 2001) transducen la señal de la feromona por lo que ambas proteínas activan efectores. Para determinar si K1Ste20p media la señal entre $K1G\alpha$ y el módulo de MAPKs se realizaron estudios para saber si $K1G\alpha$ converge en K1Ste20p y además para saber si hay una conexión entre K1Ste20 y K1Ste11p el primer componente del módulo de MAPK. En los ensayos de doble híbrido se observó que K1Ste20p es capaz de unirse a la subunidad $K1G\alpha$ de la proteína G en sus dos formas, inactiva ($K1Gpa1p$) unida a GDP y la forma constitutivamente activa (unida a GTP) que consiste en la sustitución de una Asparagina (N) por una lisina (K) en la posición 364. ($K1Gpa1p^{*N364K}$) (Figura 15 a y b). Los datos indican que la interacción se da de manera diferencial siendo mayor en la forma inactiva.

Los resultados muestran que K1Ste20p también se asocia a K1Ste11p la MEK cinasa de la vía de respuesta a feromonas (Tabla 2)

Todos estos datos sugieren que K1Ste20p es activado por dos vías diferentes, una mediada por K1G α y otra por G β (Figura 16). La activación en Ste20p por dos vías no se había reportado antes. En otras especies de levaduras alguna de las subunidades G α o G β actúa de forma negativa regulando la transmisión de la señal (Wang *et al.*, 1999) y no se ha visto que ambas activen efectores al mismo tiempo. El modelo que proponemos en este trabajo es que K1G α se encuentra en estado inactivo está unida fuertemente a K1Ste20p y cuando llega el estímulo (la feromona) ocurre un cambio conformacional y lo que ocasiona que las superficies de contacto cambien y que K1Ste20p pierda afinidad por K1G α la cual puede actuar como un potenciador permitiendo que la subunidad K1G β interaccione con el C-terminal de K1Ste20p y de esta manera la señal pueda ser amplificada al módulo de MAPK a través de la interacción de K1Ste20p con K1Ste11p^{MEKK} (Fig. 16) Hay reportes previos en donde esta interacción ya se ha descrito. En *S. cerevisiae* Ste20p puede activar el módulo de MAPKs a través de su interacción con la MEKK Ste11p la cual es activada por fosforilación en tres residuos conservados en el N-terminal de Ste11 (Ser302, Ser306 y Thr307) análisis por mutaciones puntuales indican que la fosforilación en esos sitios es importante para que Ste11p se active *in vivo* en respuesta a feromonas (van Drogen *et al.*, 2000).

Los resultados encontrados en este trabajo indican que la transmisión de la señal inducida por feromonas en *K. lactis* involucra la interacción regulada entre las subunidades K1G α y K1G β de la proteína G con los diferentes dominios de K1Ste20p. Aun no se sabe a través de que región se lleva a cabo la interacción de K1Ste20p con la subunidad K1G α , pero sugerimos que sea mediante un dominio que este situado en el extremo N-terminal, debido a que en el análisis de la secuencia, esta región es la que se encuentra menos conservada con respecto su homólogo en *S. cerevisiae* (35.9%).

Finalmente la vía de respuesta a feromonas tiene mucho que ofrecer como un paradigma para el entendimiento de la función y la estructura de las vías de señalización de varios componentes en la biología de las células eucariontes.

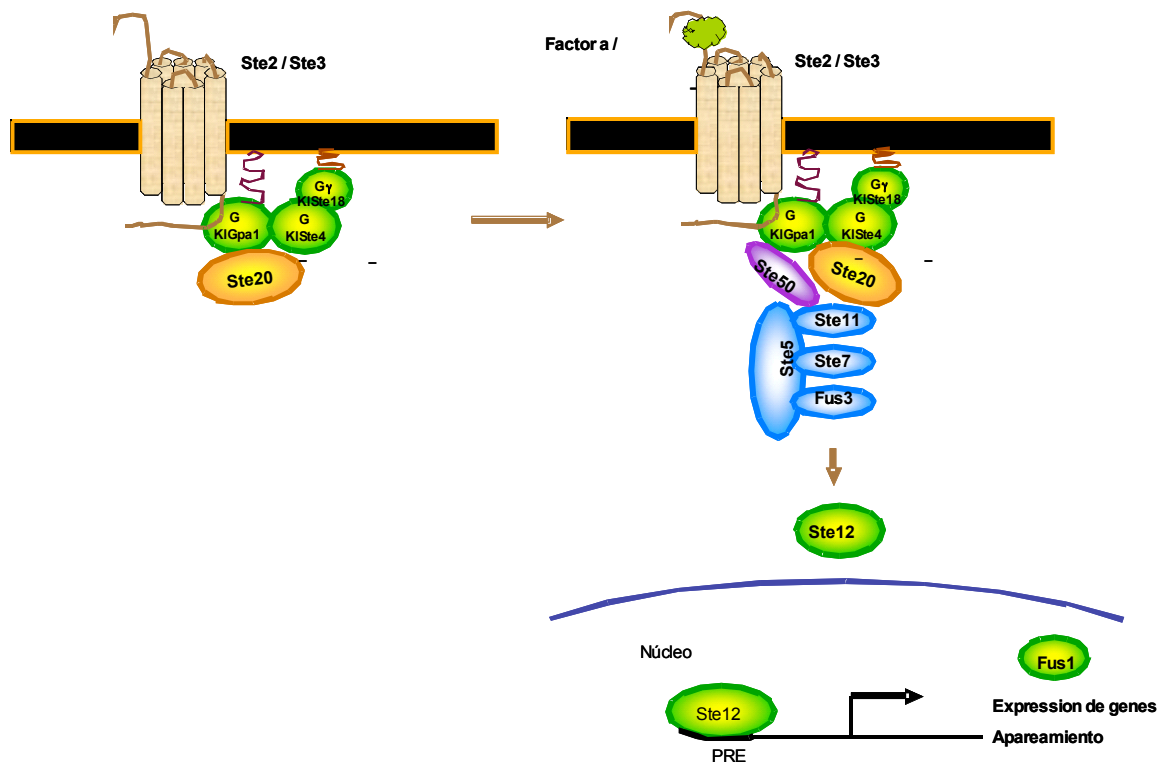


Figura 16. Mecanismo de activación de la vía de respuesta a feromonas en *K. lactis*. La proteína G heterotrimérica interactúa con Kiste20p y es a través de esta proteína que se transduce la señal ya que cuando el gen *KISTE20* está interrumpido no hay apareamiento.

8. CONCLUSIONES

- ◆ K1Ste20p es una cinasa de Ser / Thr que participa en la vía de respuesta a feromonas en *Kluyveromyces lactis* ya que una mutante en esta proteína genera un fenotipo de esterilidad.
- ◆ La subunidad K1G β interactúa con K1Ste20p y el fragmento del COOH-K1Ste20 es suficiente para que esta interacción se lleve a cabo.
- ◆ K1Ste20p interactúa fuertemente con la subunidad K1G α en su estado inactivo y cuando K1G α se encuentra en estado activo K1Ste20p pierde afinidad por esta proteína.
- ◆ Por ensayos de doble híbrido se demostró que K1Ste20p interactúa con K1Ste11p^{MEKK} aunque esta interacción es débil.

9. PERSPECTIVAS

- ◆ Comprobar la interacción entre K1Ste20p y la subunidad K1G α utilizando técnicas bioquímicas y mapear los posibles sitios de interacción entre estas dos proteínas.
- ◆ Realizar ensayos de fosforilación para saber de que manera K1Ste20p pueda estar activando a K1Ste11p.
- ◆ Realizar de ensayos de doble híbrido para saber si K1Ste20p interactúa con K1Ste5p

10. BIBLIOGRAFIA

Akada R, Kallal L, Johnson D, and Kurjan J. 1996. Genetic relationships between the G protein $\beta\gamma$ complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42: investigation of effector roles in the yeast pheromone response pathway. *Genetics*, 143; 103-117.

Ash J, Wu C, Larocque R, Jamal M, Stevens W, Osborne M, Thomas D, and Whiteway M. 2003. Genetic analysis of the interface between dc42p and the CRIB domain of Ste20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 163:9-20.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J and Struhl K. 1996. *Curr Prot Mol Biol*. John Wiley & Sons. New York. 13.12.

Banuett F. 1998. Signalling in the yeast: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62:2;249-274

Bardwell L, Cook J, Inouye J, and Thorner J. 1994. Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Develop Biol*, 166: 363-379.

Bardwell L. 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, 26: 339-350.

Bhattacharyya S, Gingras R, and Xu P. 2006 An NMR-based identification of a peptide fragment from the β -subunit of a G-protein showing specific interactions with the GBB domain of the Ste20 kinase in budding yeast. *Biochem Biophys Res Com*, 347:1145-1150.

Betz R., Manney T.R. and Duntze W. 1981. Hormonal Control of Gametogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gamete Research*, 4: 571-584.

Chong C, Tan L, Lim L, and Manser E. 2001 The mechanism of PAK activation. *J Biol Chem*, 276(20): 17347-17353.

Coates P, and Hall P. 2003 The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J Phatol*, 199:4-7.

Coria R. 1993 Señales de Transducción en levadura. Respuesta a feromonas de apareamiento. Mensaje Bioquimico, Vol. XVII. Depto. De Bioquimica, Facultad de Medicina, UNAM.

Coria R, Kawasaki L, Torres-Quiroz F, Ongay-Larios L, Sánchez-Paredes E, Velázquez-Zavala N, Navarro-Olmos R, Rodríguez-González M, Aguilar-Corachán R and Coello G. 2006. The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*, 6: 336-344.

Dowell S, Bishop A, Dyos S, Brown A, and Whiteway M. 1998. Mapping of a yeast G protein $\beta\gamma$ signalling interaction. *Genetics*, 150:1407-1417.

Glasser F, Steinberg D, Vakser I, and Ben-Tal N. 2001 Residue frequencies and pairing preferences at protein-protein interfaces. *Proteins*, 43: 89-102.

Gietz R. and Wood R. 2001. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques*. 30, 816-831. *Meth in Mol Cell Biol*, 5 (5): 255 – 269.

Elion E. 2001. Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, 3:573-581.

Esposito R. and Klapholz S. 1981. Meiosis and Ascospore Development. In J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (Eds.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 211-287.

Fields S. and Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230):245-246.

Fincham J. and Day P. 1971. *Fungal Genetics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Gietz R, and Woods R. 2001. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques*, 30: 816-831.

Gunge H, Tamara A, Ozawa F, and Sakaguchi K. 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol*, 151:462-464.

Gustin M, Albertyn J, Alexander M, and Davenport K. 1998 MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1264-1300.

Herrera T, and Ulloa M. 1998. El reino de los hongos. Fondo de Cultura Económica. 224-225.

[Herskowitz I](#). 1988 Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [Microbiol Rev](#), 52(4):536-53.

Herskowitz I 1995 MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, 80: 187-197.

Hill J, Myers A, Koerner T, and Tzagolaff A. 1986 Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 2: 163-167.

Hoffman C, Shepelev M, and Chernoff J. 2004. The genetics of PAK. *J Cell Science*, 117: 4343-4354.

Hoffman K, and Stoffel W. 1993. TMbase – A database of membrane spanning proteins segment. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166.

Inoue H, Nojima H, and Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.

Ippeita D, Watanabe N, and Kusumi A. 2001. The Ste20 Group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*, 11: 220-230.

Kawasaki L, Saviñón-Tejeda L, Ongay-Larios L, Ramírez J and Coria R. 2005. The G β (KSte4p) subunit of the heterotrimeric G protein has a positive and essential role in the induction of mating in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 22: 947-956.

Keniry M, and Sprague G. 2003 Identification of p21-activated kinase specificity determinants in budding yeast: a single amino acid substitution imparts Ste20 specificity to Cla4. *Mol Cell Biol*, 23(5):1569-1580.

Kumar R, Gururaj A, and Barnes C. 2006. p21-activated kinases in cancer. *Nature*, 6: 459-471.

Lamson R, Winters M, and Pryciak P. 2002. Cdc42 regulation of kinase and signalling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol*, 22(9): 2939-2951.

Leberer E, Dignard D, Harskus D, Thomas D, and Whiteway M. 1992. The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein $\beta\gamma$ subunits to downstream signalling components. *EMBO J*, 11(13):4815-4824.

Leberer E, Dignard D, Thomas D. and Leeuw T. 2000. A conserved G β binding (GBB) sequence motif in Ste20p/PAK family protein kinases. *Biol. Chem*, 381: 427-431.

Leberer E, Wu C, Leeuw T, Fourest-Lieuvin A, Segall J, and Thomas D. 1997. Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J*, 16(1): 83-97.

Leeuw T, Wu C, Schrag D, Whiteway M, Thomas D. and Leberer E. 1998. Interaction of a G-protein β -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature*, 391:191-195.

Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ, and Harrison EC. 2000. Structure of PAK1 in an Autoinhibited Conformation Reveals a Multistage Activation Switch. *Cell*, 102: 387-397.

Lench K, and Brent R. 1987. Miniprep of plasmid DNA. *Curr prot Mol Biol*. John Wiley & Sons. New York.

Lloret A, Saviñón-Tejeda A, Ongay-Larios L, Tenorio EP and Coria R. 2003 The *KLFUS1* gene is required for proper haploid mating and its expression is enhanced by the active form of the G α (Gpa1) subunit involved in the

pheromone response pathway of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Microbiol Lett*, 219: 105 – 113.

Manney T., Duntze W. and Betz R. 1981. The Isolation, Characterization, and Physiological Effects of the *Saccharomyces cerevisiae* Sex Pheromones. In D.H. O'Day & P.A. Horgen (Eds.), *Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes* (pp. 21-51). New York: Academic Press Inc.

Matthew J, Pryciak W, and Pryciak P. 2004 Interaction with the SH3 domain protein Bem1 regulates signaling by the *Saccharomyces cerevisiae* p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol*, 25(6):2177-2190.

Ongay-Larios L, Saviñon – Tejada AL, Williamson M, Duran-Avelar MJ, and Coria R. 2000. The Leu-132 of the Ste4 (G β) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 α factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett*, 467:22-26.

Peter M, Neiman A, Park H, van Lohuizen m, and Herskowitz I. 1996. Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* 15(24):7046-7059.

Pringle J and Hartwell L. 1981 The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In J.N Strathern; E.W. Jones & J.R. Broach (eds.) *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces* (pp. 11-26) Cold Spring Harbor; NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Qi M, and Elion E. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 1108:3569-3572.

Ramer S, and Davis R. 1993. A dominant truncation allele identifies a gene, Ste20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 452-456.

Schaffrath R and Breuning K. 2000 Genetics and Molecular Physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics Biol*, 30: 173-190.

Sambrook J, Fritsch E, and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N. Y 1.116-1.118 y 4.37-4.38.

Saviñon – Tejada AL, Ongay-Larios L, Valdés_Rodríguez J, and Coria R. 2001. The KIGpa1 gene encodes a G-Protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol*, 183 (1): 229-234.

Song J., Chen Z., Xu P., Gingras R., Ng A., Leberer E., Thomas D. and Ni F. 2001. Molecular interactions of the G β binding domain of the Ste20/PAK family of protein kinases. *J. Biol. Chem*, 276:41205-41212.

Sor F, and Fukuhara H. 1989. Analysis of chromosome patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, 5: 1–10.

Sells M, and Chernoff J. 1997. Emerging from the Pak: the p21 activated protein kinase family. *Trends Cell Biol*, 7:162-167.

Torres-Quiroz F, Kawasaki L, Rodriguez-González M, Patrón-Soberano A, and Coria R. 2007. The *KISTE2* and *KISTE3* genes encode *MAT α* - and *MATa*-specific G-protein-coupled receptors, respectively, which are required for mating of *Kluyveromyces lactis* haploid cells. *Yeast*, 24: 17-.

van Drogen F, O'Rourke S, Stucke V, Jaquenoud M, Neiman A, and Peter M. 2000. Phosphorylation of the MEKK Ste11 by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signalling *in vivo*. *Curr Biol*, 10:630-639.

van Drogen F, Stucke MV, Jorritsma G. and Peter M. 2001. MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol*. 3:1051-1059.

van Ooyen A, Dekker P, Huang M, Olsthoorn M, Jacobs D, Colussi P and Taron C. 2005. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*, 6:381–392

Wang J, Frost J, Cobb M, and Ross E. 1999. Reciprocal signaling between heterotrimeric G proteins and the p21-stimulated protein kinase. *J Biol Chem*, 274(44):31641-31647.

Wang, Y and Dohlman G. 2004. Pheromone signaling mechanisms in yeast: A prototypical sex machine. *Science*, 306:1508-1509

Wesolowski M, Breunig, K, and Fukuhara, H. 1996. *Kluyveromyces lactis* In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* (K. Wolf, Ed.), pp. 139–201. Springer-Verlag, Berlin.

Wu C, Whiteway M, Thomas D, and Leberer E. 1995. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein of extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 270(27):15984-15992.

Wu C, Leberer E, Thomas DY, and Whiteway M. 1999. Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 10:2425-2440.