



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Instituto de Fisiología Celular

INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS
PROTEÍNAS SSK1 Y SSK2 DEL SISTEMA DE
FOSFORRELEVO EN LA LEVADURA
KLUYVEROMYCES LACTIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Edgar Abraham Trejo Medécigo

Tutor: Roberto Coria Ortega

MÉXICO, D. F.

Diciembre de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Indice

Introducción	1	
Las levaduras como modelo de estudio	2	
Mecanismos de osmoadaptación en levaduras	5	
MAP cinasas	7	
<i>Fosforrelevo y Sistemas de dos componentes.</i>		9
<i>La rama Sln1 de la vía de HOG está controlada por un sistema de fosforrelevo en S. cerevisiae.</i>		12
Ssk1p y Ssk2p de <i>Kuyveromyces lactis</i>	14	
<i>Otras vías de fosforrelevo en Schizosaccharomyces pombe y Candida Albicans</i>		19
Antecedentes	21	
Hipótesis	23	
Objetivo	23	
Justificación	24	
Estrategia experimental	25	
Materiales y metodos.	27	
<i>Cepas y Plásmidos</i>		27
<i>Medios de cultivo, soluciones de antibioticos y aminoácidos</i>		31
<i>Amortiguadores</i>		33
<i>Reacciones de amplificación</i>		33
<i>Electroforesis de ADN en geles de Agarosa y Acrilamida</i>		34
<i>Purificaciones de productos de PCR</i>		34
<i>Remoción de sales y amortiguadores del ADN</i>		35
<i>Ligaciones</i>		35
<i>Desfosforilación</i>		35
<i>Digestiones</i>		36
<i>Transformación de bacterias</i>		36
<i>Miniprep de medio sólido</i>		36
<i>Transformación de levaduras</i>		37
<i>Inducción de los plásmidos recombinantes y obtención de imágenes de epifluorescencia.</i>		38
<i>Cuantificación de glicerol por método enzimático.</i>		39
Resultados	43	
Discusión	51	
Conclusiones	57	
Apendice de Resultados	59	
<i>Ensayo de Doble Híbrido</i>		59
<i>Ensayo de BiFC</i>		62
<i>Determinación de la concentración de glicerol intracelular</i>		66
Referencias	71	

Introducción

Todos los organismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales; sin embargo, dichas condiciones -como la temperatura, la humedad y la salinidad, entre otras- varían en el espacio y el tiempo, alejándose muchas veces de las condiciones óptimas para el crecimiento y reproducción de los organismos. El medio ambiente es un factor determinante en el desarrollo y evolución de los organismos, ya que induce la selección de mecanismos y estrategias que les permiten pensar, responder, sobrevivir y adaptarse a las condiciones cambiantes del mismo. Algunas de estas estrategias los llevan a modificar su metabolismo, regular su velocidad de crecimiento o modificar sus programas de diferenciación para poder sobrevivir en condiciones adversas. (8)

La disponibilidad del agua es uno de los factores medioambientales que varía en el espacio y en el tiempo de forma regular en la naturaleza, creando muchas veces condiciones adversas para el desarrollo óptimo de los organismos. Esta disponibilidad de agua puede estudiarse mediante el concepto de la actividad hídrica. La actividad hídrica se define como el potencial químico del agua en la solución y nos permite determinar la cantidad de agua necesaria para el crecimiento de un microorganismo. Se calcula dividiendo la presión de vapor del agua de la solución entre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

En el ambiente natural, la actividad hídrica puede variar rápidamente dentro un amplio intervalo de valores, resultado tanto de influencias externas, como de la actividad propia de los organismos al modificar su sustrato. Para poder mantener un volumen celular apropiado, así como una disponibilidad de agua favorable para las reacciones bioquímicas, la actividad hídrica del citosol y de los organelos de los organismos tiene que ser menor que la del medio circundante, de esta forma se logra mantener la presión osmótica necesaria para que el agua se mueva hacia el interior de la célula siguiendo su gradiente de concentración. Esta fuerza es regulada por la turgencia, la cual está establecida por la capacidad de expansión de la membrana lipídica y/o de la pared celular.

La habilidad de sobrevivir a cambios bruscos en la actividad hídrica debe ser una propiedad intrínseca de los organismos, lo que significa que éstos fueron capaces de adquirir mecanismos de supervivencia apropiados para este tipo de eventos. Estos mecanismos necesitan ser muy responsivos y operar dentro de los primeros segundos del cambio osmótico, porque la pérdida pasiva de agua puede llegar a ocurrir muy rápidamente (1, 4, 5).

La disminución de la actividad hídrica en el exterior provoca que el agua salga de la célula por difusión pasiva, de modo que la concentración de biomoléculas e iones dentro de ésta aumenta, resultando eventualmente en un arresto de la actividad celular. Bajo estas condiciones la célula sufre de una alta osmolaridad o un estrés hiperosmótico. El caso contrario, en el cual la actividad hídrica en el exterior aumenta, el agua del exterior comienza a entrar en la célula siguiendo el mismo principio de difusión, hinchando a la célula y aumentando la turgencia. Bajo ciertos límites, la membrana lipídica y/o la pared celular son capaces de evitar el rompimiento de la célula en estos eventos de estrés hiposmótico (24).

La actividad hídrica en el citosol de las células puede cambiar por una variación en la cantidad de agua en el ambiente circundante y también debido a la presencia de sustancias que son capaces de cruzar la membrana libremente. La más importante de ellas es el etanol, un producto de la fermentación del azúcar que se lleva a cabo en un número considerable de organismos. El etanol causa estrés hídrico porque afecta la hidratación de las biomoléculas (22, 23). La sal (NaCl) también estimula un estrés osmótico similar al de los azúcares o alcoholes en altas concentraciones (6). Sin embargo, el ion sodio es tóxico porque reemplaza al ion potasio en las biomoléculas (22, 23).

Las levaduras como modelo de estudio

Las levaduras son hongos unicelulares, eucariontas que viven como saprofitos en materiales vegetales o animales, donde catabolizan preferencialmente azúcares, aunque también son capaces de utilizar alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y polioles como fuente de carbono y energía (25).

Las levaduras son organismos ideales para estudios de genómica comparativa en eucariontes debido a que sus genomas son pequeños y compactos, además incluyen un número de especies considerable que se han utilizado extensivamente en estudios genéticos previamente. La divergencia entre especies de este grupo es considerablemente antigua (se estima en unos 300 millones de años) y la organización de los genomas entre las distintas especies es considerablemente diferente. La mayoría de las especies de levaduras se encuentra en la familia de los hemiascomicetos, un grupo de los ascomicetos cuya diversidad ha sido estudiada constantemente. Se han secuenciado más de veinte genomas completos de algunos integrantes de este grupo por diversas razones: para su comparación basados en su posición filogenética, por su carácter de patógenos humanos o por su interés a nivel industrial. Entre ellos se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*, por mencionar algunos.

Kluyveromyces lactis es una levadura que tiene la habilidad para asimilar la lactosa y convertirla en ácido láctico y es una especie predominantemente haploide. Su hábitat natural es diverso, pero varias cepas se aislaron originalmente de productos derivados de la leche. Al día de hoy se han identificado dos variedades de esta levadura: *K. lactis* var. *lactis* y *K. lactis* var. *drosophilorum*, la primera es capaz de asimilar lactosa mientras que la última no lo es.

K. lactis es una levadura que es importante desde un punto de vista científico y tecnológico; es un ascomiceto gemante, que se ha vuelto una alternativa atractiva como modelo en levaduras debido a que algunas de sus propiedades fisiológicas y metabólicas son diferentes a las de *S. cerevisiae*. Es una levadura aeróbica, capaz de respirar y fermentar; es negativa para el efecto “Crabtree” y es capaz de asimilar una gran variedad de fuentes de carbono. La biogénesis de su sistema respiratorio no es sensible a la represión por glucosa. Su capacidad para crecer a altas densidades y para secretar proteínas heterólogas de una manera eficiente ha impulsado su estudio por su utilización en la industria. Este y otros organismos se cultivan en fermentadores para producir quimosina a escala comercial, cuajo que reemplaza al convencional obtenido de animales sacrificados y que se utiliza ampliamente en la producción de queso. Además, también se utiliza en la producción de la B-galactosidasa a nivel industrial para la

producción de leche deslactosada.

K. lactis generalmente se cultiva en medio para levadura convencional, a una temperatura óptima de 28°C, aunque también crece muy bien a 30°C. Su ciclo de vida es esencialmente similar al de *S. cerevisiae*, con la excepción de que sus diploides no son estables y esporulan rápidamente. Es posible estudiar la genética de este organismo con técnicas convencionales como el entrecruzamiento junto con el análisis de tétradas, el knock out de genes, la transformación integrativa y replicativa, entre otras. Cuenta con seis cromosomas que varían en tamaño entre una y tres megabases. El genoma es de 10.6 Mb con aproximadamente 5300 genes. Su ADN mitocondrial es una molécula circular con una longitud de aproximadamente 40 kb. Algunas cepas contienen un par de plásmidos lineales de ADN citoplasmático, pGKL1 y pGKL, mientras que otras poseen un plásmido tipo 2μ , el pKD1.

Estas características hacen de las levaduras un buen modelo para el estudio de la adaptación al estrés hídrico. Las levaduras han desarrollado mecanismos para ajustarse, dentro de ciertos límites, a una alta osmolaridad externa y mantener o restablecer una fuerza suficiente para dirigir el agua hacia su interior. La adaptación a una osmolaridad cambiante es un proceso activo, basado en la capacidad de percibir el cambio osmótico aunado a las respuestas celulares apropiadas para poder mantener la actividad celular.

El interés inicial en el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en la osmoadaptación en las levaduras se originó por la necesidad de mejorar el desempeño de las diferentes cepas utilizadas en condiciones industriales. Dichas condiciones están asociadas a alteraciones rápidas de la actividad hídrica, especialmente a condiciones de alta osmolaridad. Otro objetivo práctico que empujó este interés fue el mejoramiento de los métodos de conservación de los alimentos, el cual requiere un mejor entendimiento de los efectos de una baja actividad hídrica en las levaduras, en especial, en combinación con otros tipos de estrés como el de calor, frío, acidez o el impuesto por los conservadores químicos. Estos aspectos comerciales motivaron inicialmente la investigación en el control del contenido celular de glicerol y trealosa, compuestos de bajo peso molecular que fungen como osmolitos para ajustar la actividad hídrica intracelular y para proteger a las biomoléculas de la desnaturalización (1, 3).

En realidad se sabe poco acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés hiposmótico; sin embargo, hay una buena cantidad de información acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta a un estrés hiperosmótico. Una estrategia fundamental en la osmoadaptación es la acumulación de osmolitos químicamente inertes, como el glicerol, y de esta manera las levaduras pueden permanecer metabólicamente activas y proliferar en un amplio intervalo de niveles de actividad hídrica (3); este intervalo de tolerancia es especie específico. (1) Más allá de ese intervalo las levaduras son capaces de sobrevivir a una casi completa deshidratación, una propiedad muy bien conocida y utilizada en la rama alimenticia. (7)

Mecanismos de osmoadaptación en levaduras

Los mecanismos de osmoadaptación se han estudiado en diferentes especies de levaduras. La más estudiada es la levadura *S. cerevisiae* debido a su amplio potencial industrial y al gran número de herramientas desarrolladas para el estudio de este organismo en muchos laboratorios del mundo. Además, el conocimiento actual muestra que hay varios mecanismos para la osmoadaptación conservados a través de diferentes grupos de eucariontes, por lo que la levadura resulta un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos involucrados en esta respuesta.

El primer componente en una vía de respuesta a estrés osmótico es un osmosensor. Existe un gran número de proteínas que se han propuesto como osmosensores por el simple hecho de que están involucradas en el proceso de osmoadaptación y por su teórica localización en la membrana. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual los osmosensores son capaces de detectar cambios osmóticos aún se desconoce y es objeto de un estudio intensivo. Pruebas definitivas de la función de una proteína como un osmosensor requieren estudios *in vitro* (21). La dificultad de la expresión, purificación y reconstitución de las proteínas transmembranales hace que dichos estudios *in vitro* aún sean escasos. Un osmosensor, por definición, no funciona como un receptor para un cierto compuesto (lo que lo distingue de un quimiorreceptor). Un osmosensor detecta (en principio) los cambios en las propiedades físico-químicas de un solvente debido a la alteración de la concentración del agua. También es posible que sea capaz de percibir un estímulo

mecánico que sea consecuencia del cambio en la actividad hídrica. Es fácil suponer entonces que un osmosensor opere al nivel de la membrana plasmática como una proteína integral transmembranal; sin embargo, es posible también que el osmosensor sea una proteína soluble. Es probable que estas moléculas sean capaces de percibir la turgencia, aunque el mecanismo mediante el cual este fenómeno puede ser posible aún se desconoce. Es posible también que la interacción con los lípidos de la membrana sea importante para la transducción de la señal, así como para su regulación (26).

Una vez que se censa el estrés hiperosmótico es necesario que se monte la respuesta adecuada para contender con dicho estrés. Para este propósito, las levaduras cuentan con una variedad de vías que utilizan diferentes mecanismos para transducir la señal hasta el núcleo, donde se orquesta dicha respuesta que culmina en la expresión de genes específicos. La vía más estudiada es la de levadura común *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, Sln1p y Sho1p se han descrito como sensores de las dos ramas que controlan la vía de glicerol de alta osmolaridad (HOG por sus siglas en ingles) (Figura 1). Estas dos ramas de la vía de respuesta a HOG (la de Sln1p y la de Sho1p) parecen estar controladas independientemente. El bloqueo de una rama no es limitante para que la respuesta, bajo una situación de estrés, ocurra rápidamente, y de hecho, estas células son resistentes a la alta osmolaridad. Aunque estas observaciones sugieren una función redundante de ambas ramas, es poco probable que la célula mantenga vías tan complejas para la activación simultánea de una misma respuesta. Es por ello que se ha propuesto y demostrado que diferentes sensibilidades en las dos vías permiten a la célula responder a un amplio intervalo de cambios de osmolaridad. (15)

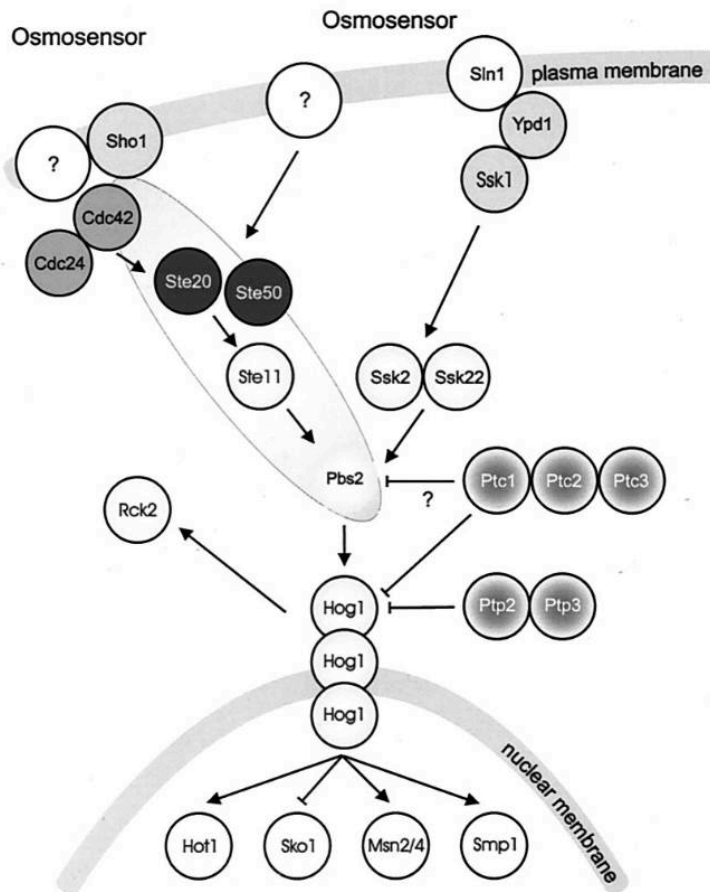


Figura 1. Esquema general de la vía de HOG. La proteína Pbs2 es el punto en donde convergen las dos ramas de activación, la de Sho1 y la de Sln1. Tomada de (24)

MAP cinasas

El descubrimiento en 1993 de la participación de las MAPK's en la osmoadaptación en levaduras generó un gran interés científico en su estudio, ya que esta vía está ampliamente conservada en los eucariontes (2).

Las vías de MAP cinasas están altamente conservadas y aparentemente están presentes en todos los eucariontes, donde juegan un papel esencial en la respuesta a diferentes señales del ambiente, hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Las vías de MAP cinasas controlan el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación, las respuestas a estrés y también están involucradas en varios procesos de enfermedad. En todas las vías de MAP cinasas existen tres niveles centrales en cuanto a las proteína-cinasas que participan (Figura 2). Estas son la MAP cinasa (MAPK), la MAP cinasa cinasa (MAPKK ó MEK) y la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK ó MEKK). La

MAPKKK fosforila y activa a la MAPKK en una serina y una treonina dentro de una región conservada en la sección amino terminal del dominio de cinasa. Posteriormente la MAPKK fosforila a la MAPK en una treonina (o serina) y una tirosina que están separadas por un solo aminoácido. Este sitio de fosforilación está localizado en el asa de activación del dominio catalítico, por lo que la doble fosforilación es necesaria para la activación de la enzima. Generalmente dicha fosforilación favorece la transferencia de la MAPK del citosol hacia el núcleo, donde fosforila a sus blancos en una treonina/serina seguida por una prolina, aunque una proporción de la MAPK se queda en el citoplasma para mediar efectos postraduccionales (9).

Las MAPKKK consisten de un dominio regulatorio en su extremo amino y de un dominio catalítico de cinasa en su extremo carboxilo. El dominio regulatorio restringe al dominio catalítico en la forma inactiva. La activación puede suceder por fosforilación a través de una proteína cinasa o por la interacción con otras proteínas, un proceso que generalmente involucra proteínas G. Los mecanismos de activación y los sensores río arriba de las vías de MAP cinasas son muy variados e incluyen receptores de tipo tirosina cinasa, receptores acoplados a proteínas G, sistemas de fosforrelevo y otros. Diferentes vías de MAP cinasas son capaces de interactuar para formar sistemas de señalización complejos. Por ejemplo, una sola MAPKK puede controlar diferentes MAP cinasas, como se ha observado en las levaduras. Las vías de MAP cinasas son reguladas negativamente por fosfatasas que actúan tanto en las MAPKK como en las MAPK, ya sean fosfatasas de serina-treonina o fosfatasas de tirosinas (9).

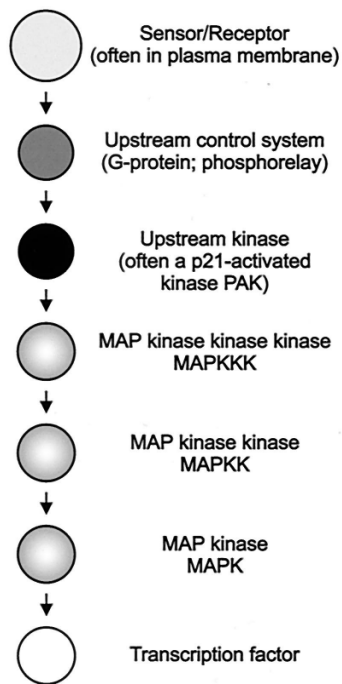


Figura 2. Nomenclatura de las diferentes proteínas involucradas en una vía de MAP cinasas. Las flechas representan la dirección del flujo de información en la vía. Tomada de (24).

Fosforrelevo y Sistemas de dos componentes.

El fosforrelevo es un mecanismo de señalización en eucariontes que está íntimamente relacionado con los sistemas de dos componentes en procariontes, los cuales fueron identificados en 1980 (4-5). Desde su descubrimiento, estos sistemas han sido objeto de un gran número de estudios y se ha podido crear un modelo de este sistema de señalización. El sistema “típico” de dos componentes está compuesto por una proteína histidina-cinasa llamada la cinasa sensora y por una proteína llamada regulador de respuesta (6).

La cinasa sensora es generalmente una proteína transmembranal que detecta cambios en el medio extracelular y responde a éstos modulando la actividad de su dominio citoplásmico de histidina-cinasa. Cuando la cinasa sensora se activa, ésta se autofosforila en un residuo de histidina -altamente conservado en las proteínas de esta familia-, y posteriormente el grupo fosforilo se transfiere a un aspartato – de igual manera altamente conservado en las proteínas de esta familia- en el dominio aceptor del regulador de respuesta, alterando su actividad. (18)

Muchos reguladores de respuesta tienen dominios de unión al ADN y funcionan como factores transcripcionales cuya actividad está regulada por la fosforilación del residuo de aspartato conservado en su dominio aceptor. De esta manera, las señales extracelulares pueden ser transmitidas por una fosfotransferencia de His-Asp en los sistemas de dos componentes. Este sistema de transducción de señales está ampliamente distribuido entre diversas vías de señalización en procariontes: quimiotaxis, esporulación, virulencia, metabolismo y en diferentes respuestas al estrés impuesto por el ambiente (6).

La caracterización de las proteínas de los sistemas de dos componentes y el desarrollo de análisis bioinformáticos, permitió la identificación de proteínas en eucariontes que están muy relacionadas a las cinasas sensoras y a los reguladores de respuesta bacterianos. Estas proteínas se han identificado como componentes de otras vías de señalización en hongos y plantas. Sin embargo, en los organismos eucariontes prevalece un sistema de fosforrelvo de varios pasos, en comparación con el sistema de dos componentes de las bacterias.

Las proteínas equivalentes a las cinasas sensoras en eucariontes son proteínas transmembranales que, además de contar con un dominio de histidina-cinasa, cuentan también con un dominio aceptor citoplasmático dentro de la misma cadena polipeptídica, y por ende, se les denomina cinasas híbridas. En estas enzimas el grupo fosforilo se transfiere del residuo de histidina al residuo del aspartato en la misma proteína. Posteriormente, hay una fosfotransferencia desde el residuo de aspartato hacia el equivalente eucarionte del “regulador de respuesta”, mediada por una tercera proteína que contiene un dominio de fosfotransferencia por histidina (HPt por sus siglas en inglés) en el que se forma un intermediario de fosfohistidina. De manera que las señales son transmitidas por una transferencia del grupo fosfato de tres pasos His-Asp-His.

Este sistema de transducción de señales se ha descrito en hongos, plantas y otros eucariontes. Se ha demostrado su participación en la respuesta a diferentes estímulos, y generalmente se encuentra acoplado a una vía de señalización muy bien caracterizada en eucariontes: la vía de MAPKs o MAP cinasas. Cabe mencionar que no se han encontrado componentes de este tipo de señalización en células de mamíferos.

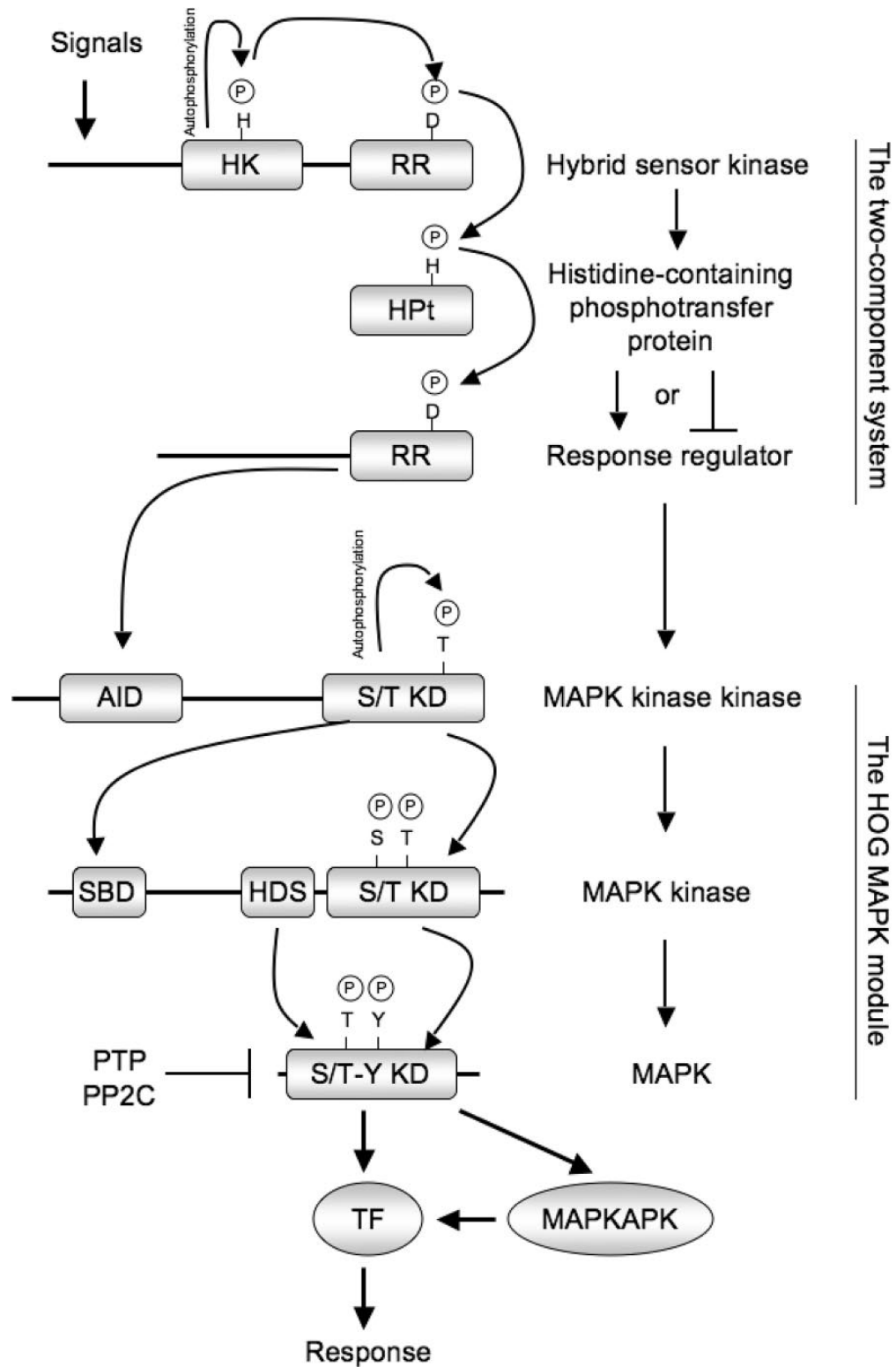


Figura 3. Representación gráfica de rama de Sln1 de la vía de HOG en *S. cerevisiae*, incluyendo el fosforrelevo y el módulo de MAPKs . Abreviaciones de los dominios: HK histidin cinasa, RR regulador de respuesta, HPt acarreador de fosfatos, AID dominio regulador, S/T KD y S/T-Y KD histidin cinasa de serina,treonina y de serina-treonina/tirosina, SBD dominio de unión a Ssk2 y Ssk22, HDS dominio de unión a HOG.

La rama Sln1 de la vía de HOG está controlada por un sistema de fosforrelevo en *S. cerevisiae*.

Aunque los estímulos físicos específicos que controlan la actividad de histidina cinasa de Sln1p aún se desconocen, los eventos subsecuentes en la vía de fosforrelevo de *S. cerevisiae* se han podido estudiar con detalle. La histidina cinasa Sln1p se activa por la hipoosmolaridad (hinchamiento de la célula) y se inhibe por la hiperosmolaridad (encogimiento de la célula). Sln1p y Ypd1p funcionan como reguladores negativos de la vía de HOG, ya que la eliminación de cualquiera de estas proteínas causa la muerte celular por la sobreactivación de la vía de HOG (16). Ypd1p, por su parte, se fosforila bajo condiciones normales de crecimiento pero el grado de la fosforilación es mucho menor después de un choque hiperosmótico. Por lo tanto, en condiciones de baja osmolaridad Sln1p se autofosforila constantemente en su propia histidina en la posición 576. Este fosfato luego se transfiere al aspartato 1144 dentro del dominio receptor de Sln1p. La fosfotransferencia ocurre entre diferentes moléculas de Sln1p (19). Posteriormente el grupo fosfato se transfiere a la histidina 64 en Ypd1p y luego al aspartato 554 en Ssk1p. Esta secuencia de eventos se ha demostrado mediante el análisis de mutantes y proteínas truncadas tanto *in vivo* como *in vitro* (12, 13, 14, 19). La transferencia de fosfato entre los diferentes pasos del sistema de fosforrelevo se dirige en un sentido preferencialmente. Se ha reportado que la transferencia del fosfato desde la histidina 576 al aspartato 1144 en Sln1p, es unidireccional, mientras que la transferencia del aspartato 1144 de Sln1p a la histidina 64 de Ypd1p es una reacción reversible, aunque favorecida hacia la histidina de Ypd1p, de forma que la fosforilación de Ssk1p está favorecida en condiciones normales de crecimiento (12, 13, 14). De hecho, se observó que la versión fosforilada de Ypd1p tiene un efecto estabilizador en Ssk1 fosforilado. *In vitro*, la vida media del Ssk1p fosforilado es de 13 minutos en ausencia de Ypd1p, y ésta se incrementa unas 200 veces en presencia de Ypd1p. Ssk1p desfosforilado activa las MPKKK Ssk2p y Ssk22p (15). Se ha identificado que la activación de Ssk2p dependiente de Ssk1p es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos, primero la unión de Ssk1p en el dominio regulatorio de Ssk2p ubicado en su región N-terminal y posteriormente la autofosforilación de Ssk2p. La interacción entre las dos proteínas se ha demostrado con ensayos de doble híbrido e coinmunoprecipitación (15, 18). La interacción entre Ssk1p y Ssk2p se lleva a cabo entre los aminoácidos 294 y 413 dentro de la región amino terminal de Ssk2p y entre los

aminoácidos 475 y 670 en el dominio receptor de Ssk1p (18). Por acción de un choque osmótico, Ssk2p se autofosforila, probablemente en un residuo de tirosina, y esta fosforilación requiere la presencia de Ssk1p, así como su correspondiente dominio de unión en Ssk2p. Se sabe relativamente poco acerca de la sublocalización celular de los componentes de la vía de Sln1.

Se ha identificado también otro regulador de respuesta en *S. cerevisiae*: Skn7p, el cual tiene un dominio de unión al ADN relacionado con los dominios de los factores transcripcionales de choque térmico en mamíferos. Skn7p puede funcionar como factor transcripcional de manera similar a la forma en la que actúan los reguladores de respuesta bacterianos, y de hecho, este regulador de respuesta se localiza específicamente en el núcleo. Se sabe que la regulación de este factor es dependiente del fosforrelevo entre Sln1p-Ypd1p, porque mutantes nulas de estas proteínas, así como del aspartato aceptor en Skn7p, alteran su actividad. Además de que la fosfotransferencia entre Sln1p-Ypd1p-Skn7p puede ser reconstituida *in vitro*. De esta manera, es posible regular la expresión de genes a través de Skn7p mediante un fosforrelevo independientemente de la vía de HOG. Sin embargo, el estímulo fisiológico para el cual es importante la respuesta de Skn7p no parece ser cambios en la osmolaridad, ya que cepas deficientes de Skn7p no muestran ninguna deficiencia en la respuesta a estrés osmótico. Es posible que Sln1p pueda transmitir otros estímulos extracelulares además de la osmolaridad al regulador de respuesta Skn7p que parece estar involucrado en la vía de integridad de la pared celular entre otras; y que lo haga mediante la translocación de Ypd1 del citoplasma hacia el núcleo (algo).

Las células deficientes en Skn7p tienen defectos en la expresión de varios genes requeridos para la protección contra el estrés oxidativo y muestran una sensibilidad incrementada a una variedad de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el cadmio y la menadiona. Skn7p podría estar involucrado también en el incremento en la expresión de proteínas de choque térmico en respuesta a estrés oxidativo, ya que forma un complejo con el factor de transcripción de choque térmico Hsf1 que puede unirse a secuencias específicas de ADN río arriba de los elementos de respuesta a choque térmico para su activación transcripcional.

Sorprendentemente, la respuesta mediada por Skn7 frente al estrés oxidativo no

depende de la fosforilación del aspartato en su dominio aceptor, ya que una proteína a la cual se le ha sustituido ese aspartato por una asparagina (D427N) es capaz de inducir la expresión de genes en respuesta a peróxido de hidrógeno; además, una mutante nula de Skn7p complementada con la proteína Skn7-D427N recupera al 100% la respuesta al estrés oxidativo de la cepa silvestre. Se ha demostrado también que dicha respuesta no requiere de la proteína Sln1 y por lo tanto es independiente del fosforrelevo.

Ssk1p y Ssk2p de *Kuyveromyces lactis*

La proteína Ssk1p de *K. lactis* consta de 635 aminoácidos codificados en una secuencia nucleotídica de 1908 bases. Aunque no hay información estructural específica de esta proteína, sabemos que cuenta con un dominio aceptor de fosfato muy similar al que está presente en los reguladores de respuestas bacterianos, tanto por ensayos funcionales como por análisis de similitud. La gran identidad de este dominio con otros ya reportados y cuya estructura ha sido resuelta nos permite hacer inferencias acerca de la estructura y de las características generales que puede tener esta proteína de *K. lactis*. Sin embargo, la información con la que se cuenta se restringe sólo al dominio aceptor de fosfato, lo cual nos limita severamente en cuanto a las inferencias que se pueden hacer sobre su dominio efector, el cual interactúa con Ssk2 provocando la activación de esta MAPKKK. La Ssk1p de *K. lactis* tiene una gran identidad con su homólogo en *S. cerevisiae*, 32% para ser más precisos, y la mayor parte de esta identidad se encuentra en sus carboxilos terminales donde se encuentra, en ambos casos, el dominio aceptor de fosfato. Al comparar este regulador de respuesta con otras proteínas similares en diferentes especies de hongos, se observa que todas las proteínas tienen una gran diversidad en su extremo amino, donde se encuentra su dominio efector, y una gran identidad en su extremo carboxilo, donde se encuentra en todos los casos el dominio aceptor de fosfato (Figura 4). Es claro que la probabilidad de que todas estas proteínas sean homólogas es muy alta; sin embargo hay un gran hueco en la información que está codificada en su dominio efector, un dominio que presenta una enorme variabilidad, donde no se conocen motivos conservados y que en última instancia controla su función y la interacción que este regulador de respuesta puede o no tener con otras proteínas.

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
K.lactis -----MQEPMNRIRPSSPLSGQRTVTSGSTRRIWLQDTPCDSFRGENPIEDTLYNQPTSVDIIEVRDMIDDVKS
K.thermotolerans -----vQ.P..IR..v...T...ie...e...d...r.T...E...
Z.rouxiiN.V.t...V...s.f...Sw.kd...s.I...e.V.t.
S.cerevisiael.k.l.k.R.....t...P.E.m.s.....K...KS.
C.glabatraM.v...n...n.t...ki.s...S.E.lq...P.n.ld.qn...a.
C.albicansk..N.....d.vk..L.N...V...V...d.q.
D.hanseiikk....PaS..S.....S.....s.I.....ni.....mq..
A.nidulansdR.....S..R.....S.....P.a.k.....Q..l...l...r.q
A.nigerv.d.....Q..l..G.T.....a.....E...s.T...k...r.g
S.pombemri.....s.v.s.h...l..i...Sg
K.lactis -----MQEPMNRIRPSSPLSGQRTVTSGSTRRIWLQDTPCDSFRGENPIEDTLYNQPTSVDIIEVRDMIDDVKS

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
K.lactis VLNKLSTNRWFRPKDNTNISLGFYYYSAELEPSSHVSVGPEKANSNTFFVITYSEYQNLIKRNQIRVGRWSQLHNSFNRLLRHRSQSPLDTAFNDNG
K.thermotoleransd.l...S.....r.s...t...S.....aQ...A.N.e.G
Z.rouxiiq..d.l...m.Pa.a...S.N..T.l..G.T...e.....Hd...L...e.
S.cerevisiae LL..S.s.y.kF.d.I.....n...K.n.T.....i--.e...n...F.m.q..SQ..i.s.N...
C.glabatras.s..Fq..N..It.....Sl...as...q...k.v...Fd.....s.s.
C.albicansd.....n.....a.....t.t..Pd.....n...R.S.i.Nn.N...n.n.n...A...
D.hanseii .i.e.....r.s.N.....q.....m.....NT...h...m.qs.....n.iHd.....a.r..L...N...
A.nidulans .L..Sh.....dTd.....n..L.....l.....T...e...v..R..v...N.L...a...i..A.e...
A.niger .L..Sh.....d.vt.....t.....T.....T.....s.v..R..i...N.L...a...i..D.s.
S.pombe .d...s...N.s.L...S.....t..P..d.N..ll..S...---.....s...S...i.T.Ne...
K.lactis VLNKLSTNRWFRPKDNTNISLGFYYYSAELEPSSHVSVGPEKANSNTFFVITYSEYQNLIKRNQIRVGRWSQLHNSFNRLLRHRSQSPLDTAFNDNG

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
K.lactis LRLMLSSQHTRQOSQSPDDNLKYAYKVIIEPDTFVMTVYRELYGGLQKSEDAITVFYPPMSSSPTSPEVLTPAELLDPIRIFTKDAIQEKEILLSDISQ
K.thermotolerans ..M...s.r.r.S...r.A..v.E.D..i...L.....lF...a.ta.a.V.s...i...A.E...v..
Z.rouxii L..aaQ..ReeSe...i...ql..k...ml.....n.SFS...S.L...eN...n.n.
S.cerevisiae V..L..n...t.ee.q..q...V..l..i.G.Q.k.i.....sSPq...e.IR..sqe...eEKD...a.
C.glabatra .ll.L..n...P...A..i..d...q.L.....l...n.d.v...I...s.l..q..mL...
C.albicans mq..ntr...ks.a.n.s...v...sv...G.r.S.s...---.n.S.n...l.l...sl...S.S.
D.hanseii .q...Q...S.n...v...sl...n...n...n.q.T...D...T...mG...E...t.
A.nidulansr...e...Y...e.li.i...---.K...vyf...-S...P...n...a.a.
A.niger .q...r...e...Y...e.li.i...---.K...svyY...S...---.P...nP...v.a.a.
S.pombeS.....rh...k...l...l...qt..s.V...v...ss.q...s.P...s.de...it.n.
K.lactis LRLMLSSQHTRQOSQSPDDNLKYAYKVIIEPDTFVMTVYRELYGGLQKSEDAITVFYPPMSSSPTSPEVLTPAELLDPIRIFTKDAIQEKEILLSDISQ

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
K.lactis GTEIDSVVERPDQRRLPFLGSGFSSSRNNTGILLPKGVSPEDIEGSDNSPYEEANISLDNIETSPHPESYALTAQKPLTEEEVGISLTKTISSELPFRP
K.thermotolerans ..ql..l...De...-a...G...SP...S.SP...VS...s...mTs...V.EE...v...I...E...
Z.rouxiin.k...-n.S...s-m.L...dD...s.yP.E.v.m.h...k...L...E...
S.cerevisiaeD.R..v...SS.NN...i.e...EA.I.i...s...k...A..LT..q...nS...
C.glabatrae...e...S...-s...s...En...S...d...l..N...S.y.qa.sL...k...T...T...k...
C.albicans GT...vl...k..n...S.....a.q.q.t.e...s.t..s.E...a...k...T...n...n...
D.hanseii G...n...rK...t...S.N...i...d.l..S...dEs..n.N.s...sq.P.T.k.iG...S...
A.nidulans ..I.t...P...P...-t.R...i...-s.eS...q...P.P.P.A.s.k...vs.r.r...kP
A.niger ..I.t...P...P...Gt...R...a.D...ssI...s.P.P...s.Q...a.r..S...kP
S.pombeE...ek...a.tn.s...L...S...n...da..mn..sS...s...P...
K.lactis GTEIDSVVERPDQRRLPFLGSGFSSSRNNTGILLPKGVSPEDIEGSDNSPYEEANISLDNIETSPHPESYALTAQKPLTEEEVGISLTKTISSELPFRP

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
K.lactis LSRRTTPSLDRQGNLPHYKVFPRINVLIVEDNAINQAILALFLRKHNGISYKVAKDGVAEIEKWEGDHLILMDLQPLLSGLEATKIRELERINNIGN
K.thermotolerans i.....si.r.kVFPkISVLVVEDN.INQAILL.FLRKh.I.YKVAKNGEAVDRWKEG..HLILMDLPLLSGIdA.KKIRELk.N.IG.
Z.rouxiie.s...KVFPkINVLIVEDN.INQ.I.LS.FLRKh.I.YKVAKNG.EAId.WrEG..HLI.MDLQPLVLSGIdA.KKIRELk.H.IG.
S.cerevisiaeL.....KVFPkINVLIVEDN.INQAILL.FLRKh.ISYKLAkNg.EAV..WKEG..HLI.MDLQPLVLSGIdA.KqIRd.Ek.N.IG.
C.glabatra .n...tL..k...KVFPkINVLIVEDN.INQAILL.FLRKN.ISYKIAkNg.EAVdKWKEGn.HLI.MDLQPLVLSGIdA.KKIRELk...I.N
C.albicans .Sq...a.n...P...V.P.IsvLVVEDNAINQAILL.FLRK..I.YqIAkNg.EAIdKWkKg..HLVLMdiQLPv.SGIEATkIR.LEKIN.IG.
D.hanseii .S.....K...L...V.P.IsvLVVEDNAINQAILL.FLRK..I.YqIAkNg.EAVdKW.R.G..HLVLMdiQLPv.SGIEATkIR.LEKIN.IG.
A.nidulansLn...S.K.N...P.INVLIVEDN.INQ.I.LL.Fmkr..v.wK.A.nG.EAV.KWREG..HLVLMdiQLPvnmGldATkIR.LERIN.IG.
A.nigerSL...S.K.N...P.INVLIVEDN.INQ.I.LL.Fmkr..v.wK.A.nG.EAV.KWrgG..HLVLMdiQLPvnmGldATkIR.LERIN.VG.
S.pombe v.....V.P.INVLIVEDN.INQ.I.LL.Fmkr..IS.eVAKDGLAELEKwKk...HLILMDiQLP.msGie.TqeIR.LERIN.IG.
K.lactis LSRRTTPSLDRQGNLPHYKVFPRINVLIVEDNAINQAILALFLRKHNGISYKVAKDGVAEIEKWEGDHLILMDLQPLLSGLEATKIRELERINNIGN

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
K.lactis FSQKSVSKKPNLKNANSKEEGGTTAAKTSQDQNEVEKSNQNMVLDKSKFRSPVIVALTASYSQ-IDRTEALLAGCNDYLTKPVNLDLWLSKKITENGWC
K.thermotoleransh.e...-----k.apVIIALTAS.SQ-.DKTEALLAGCNDYLTKPVNLDLWLSKKITENGWC
Z.rouxiir...s.K.N-----K.q.apVIIIVA.TAS.SQ-.DK.EALISGCNDYLTKPVNL.WLS.KI.ENGWC
S.cerevisiaen.S...K.S-----K...gaPVIIALTAS.SQ-mdk.kALLSGCNDYLTKPVNL.WLSKKITENGWC
C.glabatra .Ser..t...N-----SPVIIALTAS.SQ-.DK.EALISGCNDYLTKPVNL.WLSKKITENGWC
C.albicans F.e.i.K...i-----e...L..n.FRSPVIIALTAS.n.vDKT.AL.AGCNDYLTKPVNL.WL..KITENGWC
D.hanseii FaQ..ls.....ked..LD.t.FRSPVIIALTAS.n.vDR..AL.AGCNDYLTKPVNL.WL..KITENGWC
A.nidulans F.kks.....s-----d...eed.l.D.S.FkSPVIIALTAS..Q-.DR.EAL.AGCNDfLTkPV..eWL.qkVTEWGC
A.niger F.k.a.r...NA.S-----S...E...ed.l.D.S.FkSPVIIALTAS..Q-.DR.EAL.AGCNDfLTkPV..eWL.qkVTEWGC
S.pombe .a.K...-----g...ekd.l.e.-KfQSPVIIALTAS...-DR.EAL.AGCNDfLTkPVsL.WL.KKITENGWC
K.lactis FSQKSVSKKPNLKNANSKEEGGTTAAKTSQDQNEVEKSNQNMVLDKSKFRSPVIVALTASYSQ-IDRTEALLAGCNDYLTKPVNLDLWLSKKITENGWC

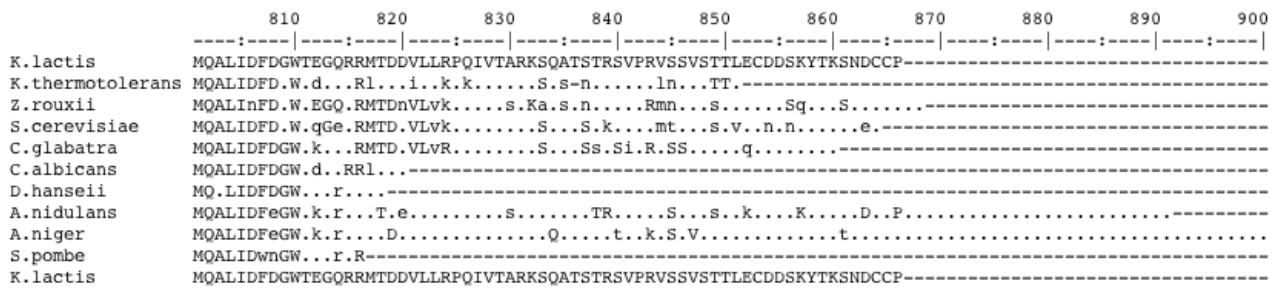
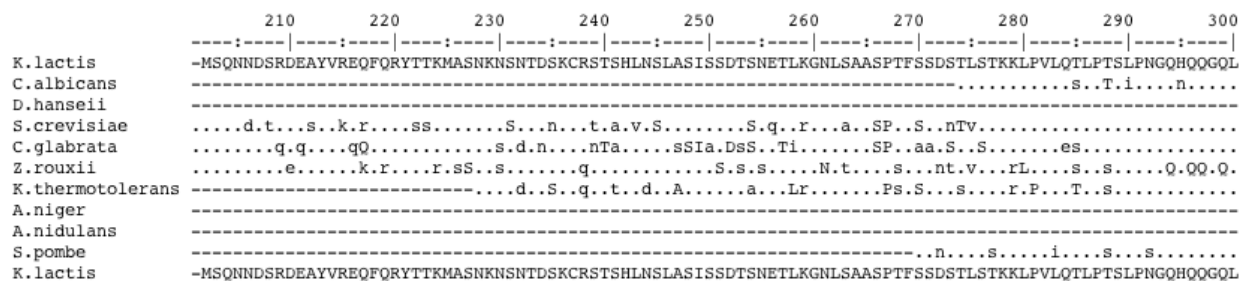


Figura 3. Alineamiento múltiple de diferentes reguladores de respuesta en diferentes especies de hongos. Se utilizó el algoritmo de Clustal W. Los guiones representan huecos en el alineamiento, los puntos aminoácidos no relacionados, los residuos similares están representados en letras minúsculas y los residuos idénticos en letras mayúsculas.

La proteína Ssk2p de *K. lactis* cuenta con 1551 aminoácidos codificados por 4656 nucleótidos. Al igual que la proteína Ssk1p, no se cuenta con información estructural específica de esta proteína; sin embargo tiene un dominio característico de las MAP cinasas y una identidad del 49% con la MAPKKK Ssk2p de *S. cerevisiae*, que la posiciona claramente como un posible homólogo funcional de esta última. A diferencia de los reguladores de respuesta, un alineamiento con otras proteínas similares de diferentes especies de hongos nos permite observar cierta similitud en su extremo amino, donde se encuentra el dominio regulador, y un gran porcentaje de identidad en su extremo carboxilo, donde se encuentra su dominio de cinasa (Figura 5). De igual forma, queda claro que las inferencias que se puedan hacer acerca de su función como MAPKKK estarán bien respaldadas, pero las inferencias acerca de su regulación y de la forma en la que interactúa con otras proteínas por medio de su dominio regulador están limitadas.




```

310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  FPASSSSSAISSRKPSVSGSFGTQPTTAQLKTTITSPKLSGALSTRSRNSLTSKLFALNQSNDSPTSSTSVYVPPVNVASLNSQTASSMSVSTADQY
C.albicans .....SS..t..r..t..a.....T..s.....n..s..s..R..s..i..s..n....i..h..r..s..P..n.....S..s..S..r..n..a..n..t....
D.hanseii .....Vn..S..Gs.....s..s.....sa..q.....vn.....n..n..s.....S.....S.....a.....St.....S.....
S.crevisiae ..A..SS...s.....n.....sT..v.....e..S...S...k..a..nS...L..t....S..l..l....Si..S...n..n..tsn....
C.glabrata .....a..Sna..n..S.....t..G..T..s.....Ta...t.....v.....t.....d.....n.....sn....
Z.rouxii   .....S.....s..S..R...G.....T.....s.....S.....R..nsn.....a..S..n.....S.....s.....n..S.....
K.thermotolerans .....SaSA..t...ama..a..Gs.....S.....S..s..s..n..a....S...s..s..S..SP.....st..S..T..Sa..S..as....
A.niger    .....m...d..nN....s.....m.....s.....t....Q.
A.nidulans .....m.....la....
S.pombe   .....t...a...S.....S..t.....e.....S.....S.....R..e..P..a..al...P.....e...a..a..vS..S....
K.lactis  FPASSSSSAISSRKPSVSGSFGTQPTTAQLKTTITSPKLSGALSTRSRNSLTSKLFALNQSNDSPTSSTSVYVPPVNVASLNSQTASSMSVSTADQY

```

```

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  FPAQONGSTTTVNLPTLSSPSIRSLNNSSTTSTTKFKPLQKQYVNLNEQLYLSMKNKKADDYYTRGITSSGNEDDDDFRVDGENDVDNDLSKLNGLG
C.albicans .....N..s...is...t.....NS.....re.....rsr.....stS.....e.....n..S..d....
D.hanseii .....N..n..ss..i..s..nS..n..S..S..T..Ss..K.....rsr.....s.....N..n.....d....
S.crevisiae ..sQ..NGSTss..L...vtt..S..q.....st..S..r..kQYVNLNEQLYL..MrNr..DDYYTRGI..as..N..edDe....k..eD.....d....
C.glabrata .....vd.....nP.....N.....ssr.....skkv.....s.....e.....s.....n..GN..n..i..n...nd..nN..S...N...
Z.rouxii   .....t..T..s.....S..S..kS...tss..S..r..kQYVNLNEQLYL..MrNr..DDYYTRGI..a...DDe....d..D..n..n...G
K.thermotolerans .....S..s..s..s.....--hstSsss..S..KPMQKQYVNLNEeLYL..MKN...DDYYTRGI..as..NdeeDe...D..Ed..D..D.....N...
A.niger    .....S..S.....S..S..t.....S..S...k...m...V...lr..q.....R..snt.....g....nd....S....
A.nidulans .....T...s..TL...a..S..sn..T..T..aF..m...V...L...lr..qq...h..R..snt.....DD....S.....
S.pombe   .....Sss.....nl.....s..ss..S...i..K...i..E..Ym...rs..s.....I..St.....e.....S.....i..
K.lactis  FPAQONGSTTTVNLPTLSSPSIRSLNNSSTTSTTKFKPLQKQYVNLNEQLYLSMKNKKADDYYTRGITSSGNEDDDDFRVDGENDVDNDLSKLNGLG

```

```

510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  SAIFGNNIATTTDKGFHSIDDELVLMMNDKILLERMEWLRSEVPEPNPLIENSLLNLLNKTGGSTDSLESFSNIETQLALEQLSNHNLVRERLEWQMTLSSV
C.albicans .....h..vs...D....DDDE....D....l....d.....aLsLm..s....v.....tdd..i..ERLEWQsMLTsv
D.hanseii .....d.....n.....DeDE.....l....d.....a..LL...a..n..n..n..q....add..v..ERLEWQsMLTsv
S.crevisiae .....d---n..Gyn..I.....N...m.....k...d...d...i..de...S...E.....L..kL..N..mV..R..EWQMTLSV
C.glabrata ..n...N---n...nn..D..n.....s.....s..d...n..a..E.....i..QL..d..V..KR..EWQMTLanV
Z.rouxii   t..F....d...e...am...Ll...e..l.....L..E..t..s..d..s..s..nL...t...L..OLSdh..LV..ER..EWQMTLSnV
K.thermotolerans t...G....t...I...L...D..l....d.....P.....a.....s...LqrLa..N..V..ERLEWQ.MLanV
A.niger    .....D.....De...M...S.....d.....t..N..T---e...N...qERLEW..sMLSSV
A.nidulans ..n.....D.....e...v...S...d.....d.....a..N..s---e...N...qERLEW..sMLASV
S.pombe   .....s.....D..e.....i.....N...E...dL..seT.....d..L..N...KER..EWQ..MLTSV
K.lactis  SAIFGNNIATTTDKGFHSIDDELVLMMNDKILLERMEWLRSEVPEPNPLIENSLLNLLNKTGGSTDSLESFSNIETQLALEQLSNHNLVRERLEWQMTLSSV

```

```

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  LNGDIVKSEKTKLAKR-----KPDEILLNHNDLWLELKAWLNGRTVEDQRKSLEYSKTTADEVFEEILLNKYKEEENPEVVI-EAKILLNKYKVVG
C.albicans ..L.GdvVrSEKTKi.....q...l....e..lW...i..rA..i..RT..deQRK..v..Y..rT..Dql..ddvM..fe..d..E..s..d...I..dq..K..iLdrY..q...
D.hanseii ..L.GdvVrSEKTKi.....q...l...y..e..lW...i..A..L..RT..dDQRK..iEY..rT..AD..lfdEVLNfe...dd.....q...lLdkY..K...
S.crevisiae ..L.GDIVrNEKTKiA.q....K.....sD..iNIElKAWMNGRTVEDQ..KSL...r..s..D..VFqEIm..fK..E...s..d...-E..K..LvdKYYrVl..
C.glabrata ..L.GDIVKSEKTKiAK...-K.....ysD..iWLELKAWMNGR..VdDqKSLk..r..sADEVFq.vLdfr.....d...-E...LmNKYYrVi..
Z.rouxii   L.GDIVKSEKSiA.q....e...m...ys...lWLELKAWMNgk..V..D..kK..LE..rTSAD..VF..EIm..fK..ked...PE...q..r..LLNrYqV...
K.thermotolerans L.GDIVKSEKSiA.q....e...y..D..lWLELKAWMN..RTIEeek..tLEY..r..s..D..VFqEImd...d...e..v...K..LidrYhqV...
A.niger    ..L.GdvVK..EK..rL...-k.....Nn..iWL..vra...GRsv...QRK..iE..ar....i..EEIi..fe..k..E.....kq..e..iv..q..r...
A.nidulans ..L.GdvVK..EK..rL...-N...IWL..vra...GRsl...QRK..iE..ars...i..E..iInfe..k..E.....kq..e..iv..q..K...
S.pombe   ..L.GDIVrSEK..rL..K...-e...dysD..lWMeI..WL..Rsvd...RenLkh..rT...dV...ImNf..de--s..El.....mL..K..K...
K.lactis  LNGDIVKSEKTKLAKR-----KPDEILLNHNDLWLELKAWLNGRTVEDQRKSLEYSKTTADEVFEEILLNKYKEEENPEVVI-EAKILLNKYKVVG

```

```

710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  YWKNLPMNMLEKPVTKTSNFVSRIEALNSLINSYEGLOVEIEALKQWTONDDLDVTFTKDSLDT-----G-----IFKNDRSFAEQIMKEKDIEGI
C.albicans ..WK..L..dM..dkP...rs..F..nRidAL..a..l...d..i..e..KsLr..W...NdeLDiT..s...v..s...ednks..AerlMKEKDVq..I
D.hanseii ..Wr..L..dM..EKPV..rTa..F..RidAL..a..ls..d..mQ..E..dsLK..W...NdemDiT..sr...s...ednks..AerlMKEKDV..I
S.crevisiae ..W..Ni...Mh..EKPiTKT..F..nRid..LNS..lN...I...LkKw...n...s..Te...T.....N..k..FAEQIMKEKDIE..I
C.glabrata ..W..Nm...l..dkPi..KT..F..nRid..LdS..lN...e..kI...ir..W...T...eIn.....FADqmiKEKDIE..I
Z.rouxii   YW..NL..M...KPiTKT..FVnRvdsM..l..l..q..e...ksLK..W...deeLDmT...e..s..D-----Nn...FAEQIMKEKDIE..I
K.thermotolerans Ywr...hMh..dkPVT...Fi..Rv..AmNt..l...q...e..EIEALKWtND..LDV..FT...D..E-----G-----vyKNDR..FAEQIkerDIE..I
A.niger    ..y...l...P...s..y..S..dAv..a..Nt...i..El..LqKw...NdeLD..s..sr...de..SF..drIMKE..lk.l
A.nidulans ..y...l...P...s..y..S..dAv..a..Nt...i..El..LqKw...N..eLD..s...de..SF..drIMKE..lk.l
S.pombe   ..y..s..si..E..l..s..sf..kld..L..a..N...Le..qv..ir..w...NeemDiT...n...sn..F..Er..rE..l...
K.lactis  YWKNLPMNMLEKPVTKTSNFVSRIEALNSLINSYEGLOVEIEALKQWTONDDLDVTFTKDSLDT-----G-----IFKNDRSFAEQIMKEKDIEGI

```

```

810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
K.lactis  FQKK-IFFKHAPWMFKSKLVFLKQONSIEHMRPLPVDKHLSSLTFPLRLIQEIIISIRLEYARKLKKPT---MMIDQMIDDFSTYIKLSVQIKHTLMEY
C.albicans ..FrKr-IF...APWM..KSK..yir.....MkLP..l..L..i...PvRLikeIv..vRL..YA..KLq..PT---lMMIDQMIDDF..sYI..valevK..i..EY
D.hanseii ..FQKr-IF...APWM..KSK..yLr..h...lKLP..i..L..L...PmkLlKeIInVRL..YAKKLe..PT---lMMIDQMIDDF..sYI..ialevK...ivEY
S.crevisiae ..FQKK-IF...APWi..KaK..FLK..Q..t..nEL..L...L..LL..FPMRLVkdII..IRL..YAKKiq..PT---lMMIDQmMDDFSTYIKLAVQmK..Tv..Y
C.glabrata ..FQKr-IF...APWi..KaK..FLK..rdtlnEL..L...DqL..LL..FPMRLVkdII..IRL..YAKKlqKPT---MMIDQMIDDFnsYIrvaVQmK..Tvi..Y
Z.rouxii   FQKK-IF...APWi..eaKl..F..r..Q..m..Ei..v...L..LL..FPMRLVkeII..IRL..YAKKlK..PT---MMIDQMieDfTsYIKLSVQIKyTvi..Y
K.thermotolerans FQKK-IF...APWi..KaK...tv..EM..LPL..neL..LL..FP..kLVkEII..IRiEYAKKlq..PT---MMIDQMIDDFsYIrLSVQIKHTVi..Y
A.niger    ..K..m...i..KaK...ie...S..k..LP..ieeL..Li..FP..RLIQEII..vRL..YAK..mK..P...ilvDQMI..F...mKvav..IK...ld..
A.nidulans ..e..m...i..KaK...ie...S..k..LP..ieeL..Li..FP..RLIQEII..vRL..YAK..mK..P...ilvDQMI..F...mr..av..IK...ld..
S.pombe   Feqr-I.....l..K...v...d..l...LPL..D...LLsFP..RLIKeI..lnRL..A..i...s---l..ID..lIDD...mKvav..I.....
K.lactis  FQKK-IFFKHAPWMFKSKLVFLKQONSIEHMRPLPVDKHLSSLTFPLRLIQEIIISIRLEYARKLKKPT---MMIDQMIDDFSTYIKLSVQIKHTLMEY

```


	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
K.lactis	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
C.albicans	RS	W	L	K	V	E	A	I	E	F
D.hanseii	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
S.cerevisiae	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
C.glabrata	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
Z.rouxii	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
K.thermotolerans	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
A.niger	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
A.nidulans	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
S.pombe	W	L	K	V	E	A	I	E	F	L
K.lactis	RS	W	L	K	V	E	A	I	E	F

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
K.lactis	MEE	Q	R	N	S	V	D	L	V	T
C.albicans	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
D.hanseii	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
S.cerevisiae	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
C.glabrata	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
Z.rouxii	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
K.thermotolerans	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
A.niger	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
A.nidulans	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
S.pombe	D	r	w	...	D	r	w	...	D	r
K.lactis	MEE	Q	R	N	S	V	D	L	V	T

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
K.lactis	DDE	I	M	D	I	K	S	T	K	I
C.albicans	e	E	I	L	I	L	S	V	G	D
D.hanseii	e	E	I	L	I	L	S	V	G	D
S.cerevisiae	D	D	I	I	K	S	T	K	I	S
C.glabrata	e	E	I	L	I	L	S	V	G	D
Z.rouxii	D	D	I	I	K	S	T	K	I	S
K.thermotolerans	D	D	I	I	K	S	T	K	I	S
A.niger	e	E	I	L	I	L	S	V	G	D
A.nidulans	n	...	n	...	n	...	n	...	n	...
S.pombe	n	...	n	...	n	...	n	...	n	...
K.lactis	DDE	I	M	D	I	K	S	T	K	I

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
K.lactis	MLG	V	V	L	V	F	C	P	T	K
C.albicans	Y	V	L	...	Y	V	L	...	Y	V
D.hanseii	Y	V	L	...	Y	V	L	...	Y	V
S.cerevisiae	L	G	V	L	...	L	G	V	L	...
C.glabrata	L	G	V	L	...	L	G	V	L	...
Z.rouxii	L	G	V	L	...	L	G	V	L	...
K.thermotolerans	L	G	V	L	...	L	G	V	L	...
A.niger	v	Y	V	...	v	Y	V	...	v	Y
A.nidulans	v	Y	V	...	v	Y	V	...	v	Y
S.pombe	v	Y	V	...	v	Y	V	...	v	Y
K.lactis	MLG	V	V	L	V	F	C	P	T	K

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
K.lactis	LK	N	F	G	S	V	Q	K	N	V
C.albicans	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
D.hanseii	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
S.cerevisiae	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
C.glabrata	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
Z.rouxii	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
K.thermotolerans	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
A.niger	m	s	...	m	s	...	m	s	...	m
A.nidulans	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
S.pombe	L	S	...	L	S	...	L	S	...	L
K.lactis	LK	N	F	G	S	V	Q	K	N	V

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
K.lactis	IEE	K	E	F	K	L	K	E	K	I
C.albicans	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
D.hanseii	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
S.cerevisiae	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
C.glabrata	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
Z.rouxii	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
K.thermotolerans	l	E	e	F	...	l	E	e	F	...
A.niger	m	d	d	...	m	d	d	...	m	d
A.nidulans	m	d	d	...	m	d	d	...	m	d
S.pombe	m	d	d	...	m	d	d	...	m	d
K.lactis	IEE	K	E	F	K	L	K	E	K	I

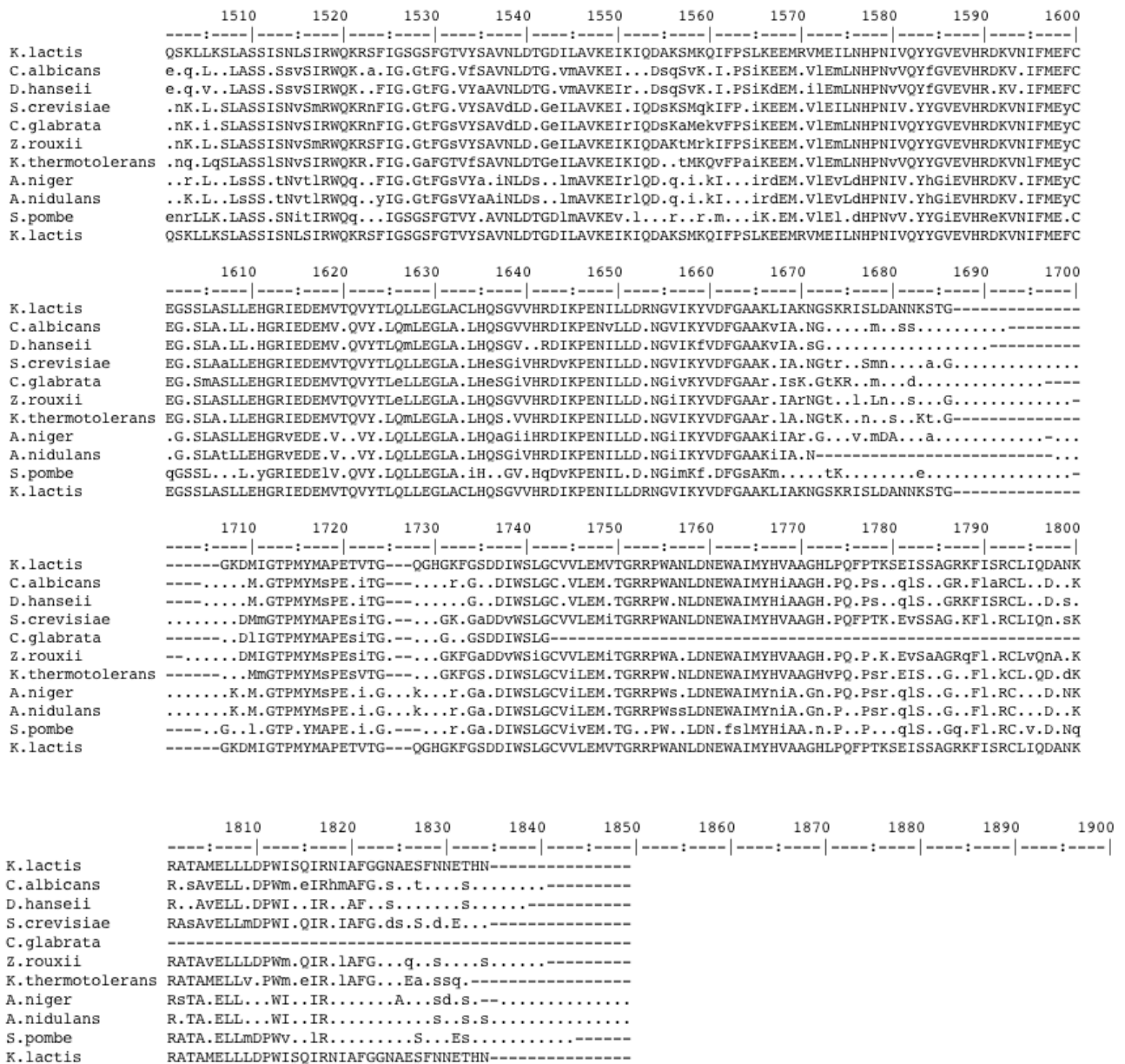


Figura 5. Alineamiento múltiple de diferentes MAPKKs en diferentes especies de hongos. Se utilizó el algoritmo de Clustal W. Los guiones representan huecos en el alineamiento, los puntos aminoácidos no relacionado, los residuos similares están representados en letras minúsculas y los residuos idénticos en letras mayúsculas.

Otras vías de fosforrelevo en *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida Albicans*

Mediante estudios de genética comparada y gracias a la disponibilidad de información genómica de diversos organismos ha sido posible identificar proteínas que forman parte de un fosforrelevo en *S. pombe*. Esta levadura cuenta con tres proteínas histidina-cinasas híbridas, una proteína con dominio HPt y dos reguladores de respuesta. Dos de estas cinasas híbridas (Mak2 y Mak3) y un regulador de respuesta

(Spc1) parecen funcionar de la misma forma que la vía de HOG en *S. cerevisiae*; sin embargo, la vía de *S. pombe* responde a un espectro más amplio de estreses ambientales: estrés osmótico, estrés oxidativo, choque térmico y privación de nutrientes. Dentro de los tipos de estrés que activan al regulador de respuesta Spc1, el estrés oxidativo (particularmente el ocasionado por el peróxido) es percibido y transmitido por el fosforrelevo Mak2/Mak3-Mpr1-Mcs4 hacia la cascada de MAPK por el regulador de respuesta Spc1. Así que a pesar de que la estructura general de ambas vías de señalización (la de *S. cerevisiae* y la de *S. pombe*), tanto en el fosforrelevo como en la conexión con la vía de MAPK's, cada una se encarga de censar estreses totalmente diferentes. Además, el regulador de respuesta Spc1 parece estar involucrado en el control de la división celular.

En *C. albicans* se han identificado proteínas homólogas a las que conforman el sistema de fosforrelevo en *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Se encontraron tres genes que codifican para histidin-cinasas (CaSln1, CaHK1 y CaNIK1) que, al parecer, también son cinasas híbridas que contienen un dominio receptor en el mismo polipéptido. La histidin-cinasa CaSln1 se encontró mediante la complementación del fenotipo en una mutante *-sln1* de *S. cerevisiae*, y en efecto, su estructura esta íntimamente relacionada con la proteína Sln1 de *S. cerevisiae*. Sin embargo, a diferencia de lo que pasa en una mutante nula de Sln1 en la levadura, la mutante nula de CaSln1 es completamente viable y no muestra ningún fenotipo reconocible cuando se somete a estrés hiperosmótico. Hasta al momento no hay evidencia que sugiera la participación de la histidin-cinasa CaSln1 en la activación del homólogo de HOG en *C. albicans* como respuesta a un estrés osmótico.

Análisis mutacionales indican que las tres histidinas de *C. albicans* parecen ser importantes para el desarrollo de las hifas. El crecimiento hifal inducido por suero se ve afectado significativamente en mutantes nulas de cualquiera de estas proteínas. Al igual que en *S. cerevisiae*, *C. albicans* posee una sola proteína con dominio Hpt y dos reguladores de respuesta, ambos homólogos a cada uno de los reguladores de respuesta descritos en la levadura del pan. Aunque no se conocen los componentes río debajo de esta vía de señalización, se sabe que el regulador de respuesta CaSsk1 no está involucrado en la vía de respuesta a estrés de la célula.

Antecedentes

Diferentes estudios realizados en el laboratorio han arrojado datos (aún no publicados) que nos llevan a creer que hay diferencias sustanciales entre el sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* y el de *K. lactis*; de hecho, el mecanismo de activación de esta rama en la segunda levadura podría ser exactamente el opuesto.

La rama de fosforrelevo en *S. cerevisiae* funciona como un regulador negativo. La histidina cinasa Sln1p está fosforilada constantemente en condiciones normales de osmolaridad, lo cual mantiene al regulador de respuesta Ssk1p fosforilado e inactivo. Al hacer mutantes nulas de esta histidina cinasa o del acarreador de fosfatos Ypd1p en *S. cerevisiae*, se interrumpe irreversiblemente el fosforrelevo, por lo que Ssk1p sólo se encuentra en su forma desfosforilada, como cuando se induce un cambio de osmolaridad por un shock hiperosmótico, lo que provoca una sobreactivación de la vía de señalización que mantiene a HOGp constitutivamente fosforilado, provocando en última instancia la muerte celular por un arresto irreversible del ciclo celular. Sin embargo, al hacer estas mismas mutantes en *K. lactis*, nos encontramos con un fenotipo bastante atípico: no hay letalidad y la levadura es capaz de crecer a niveles muy similares a los de las cepas silvestres en condiciones de osmolaridad normal y alta (Figura 6).

Al considerar que la gran mayoría de las histidina cinasas de bacterias sólo se activan ante la presencia de un estímulo específico, se planteó una primera hipótesis para explicar el fenotipo observado: si la histidina cinasa de *K. lactis* se encuentra apagada en condiciones de osmolaridad normal y sólo se activa en condiciones de hiperosmolaridad, la eliminación de ésta o del acarreador de fosfato no tendrían un fenotipo letal, puesto que la forma activa del regulador de respuesta, Ssk1p, sería la forma fosforilada.

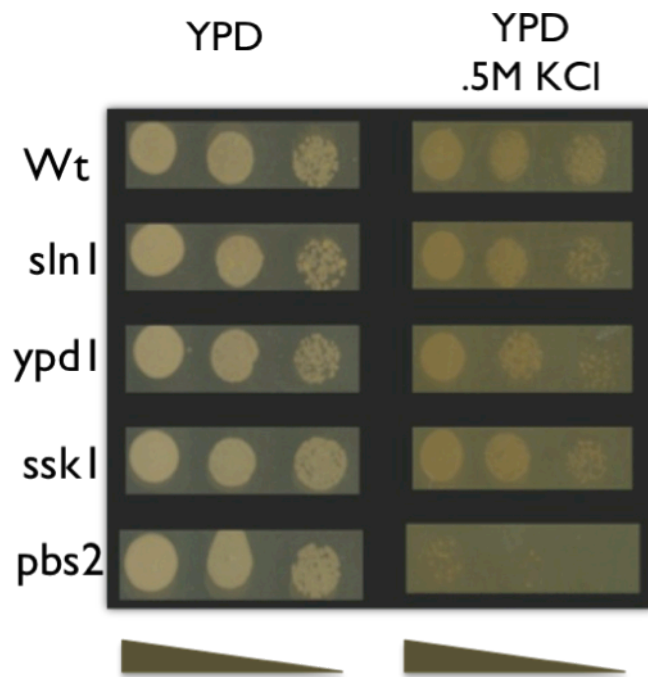


Figura 6. Ensayo de diluciones seriadas de diferentes mutantes nulas de *K. lactis* en donde se evalúa cualitativamente el crecimiento de las células. Experimento realizado por Miriam Rodríguez.

Hipótesis

La versión fosforilada de Ssk1p es la forma activa del regulador de respuesta. Esta versión interactúa más fuertemente con Ssk2 y provoca su activación en condiciones de hiperosmolaridad para llevar a cabo la respuesta a través de la vía de HOG.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es determinar el tipo de interacción, si es que existe, entre las proteínas Ssk1 y Ssk2 de la levadura *K. lactis*, las cuales están involucradas en una vía de fosforrelevo que responde a estrés osmótico. Los objetivos de este proyecto se pueden resumir en los siguientes puntos:

Identificar si hay o no interacción entre las proteínas Ssk1 y Ssk2 de *K. lactis*.

Identificar la forma de Ssk1 que interactúa con Ssk2: la fosforilada o la no fosforilada.

Identificar la interacción *in vivo* de estas proteínas y así determinar el papel funcional que tienen en la respuesta a estrés hiperosmótico.

Justificación

Los sistemas de fosforrelevo se han descrito en un número limitado de organismos, la mayoría de ellos en hongos y en menor cantidad en plantas, aunque en ambos casos, por lo general, de una manera pobre. Hasta la fecha, la vía de fosforrelevo de la cual se tiene la mayor información es la de *S. cerevisiae*, la cual se ha estudiado exhaustivamente y, por lo general, se utiliza como modelo, extrapolando los mecanismos que la rigen a otras vías de fosforrelevo. Sin embargo, la cantidad minúscula de detalles que se saben de otras vías de fosforrelevo, nos impulsa a estudiar estas vías en otros organismos.

La levadura *K. lactis* es un organismo modelo alternativo para el estudio de diferentes procesos moleculares que rigen el funcionamiento de la célula. Es por ello que se desea estudiar este fenómeno en un organismo alternativo. El trabajo previo en el laboratorio, además, nos arroja datos (aún no publicados) que nos llevan a creer que hay diferencias sustanciales entre el sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* y el de *K. lactis*.

De confirmar la hipótesis planteada nos encontraríamos en una situación muy interesante. El hecho de que una misma vía -que al parecer funciona en respuesta al mismo estímulo y que está relativamente conservada entre diferentes grupos de eucariontes-, funcionase de manera totalmente opuesta en estos dos organismos, nos hablaría de una divergencia importante y de un proceso de adaptación con implicaciones evolutivas muy interesantes.

Estrategia experimental

Para poder concretar los objetivos de este proyecto se planteó el uso de diferentes técnicas. En primera instancia, para poder corroborar la interacción entre el regulador de respuesta K1Ssk1p y la MAPKKK K1Ssk2p se optó por realizar un ensayo de doble híbrido. En este ensayo, cada una de las proteínas blanco se fusionan con un dominio distinto de un factor transcripcional, de manera que si dichas proteínas blanco interactúan entre sí, el factor transcripcional se reconstituye y se expresa un reportero que nos permite determinar visualmente la interacción.

Gracias a que contamos con una versión no fosforilable del regulador de respuesta K1Ssk1p, es posible utilizar este mismo ensayo para explorar cual es la forma del regulador de respuesta que interactúa con la MAPKKK. Esto se logra al realizar dos ensayos diferentes, en cada uno de ellos se evalúa cualitativamente la fuerza de la interacción de la forma silvestre o de la forma no fosforilada del regulador de respuesta con la MAPcinasa.

El doble híbrido, sin embargo, es una técnica exploratoria para identificar la interacción entre dos proteínas, ya que ambas son forzadas a entrar al núcleo y a interactuar en un ambiente en el que no se encuentran en condiciones fisiológicas.

Una técnica de gran utilidad para corroborar, y además explorar con más detalles el fenómeno, es la fluorescencia por complementación bimolecular o BiFC, por sus siglas en inglés. Esta técnica se basa en fusionar a cada una de las proteínas blanco uno de dos fragmentos distintos y complementarios de una variante de la proteína amarilla fluorescente, la Venus YFP. Si ambas proteínas interactúan entre sí, la proteína fluorescente se reconstituye y se observa fluorescencia. Al abordar la interacción con este enfoque es posible observar el fenómeno *in vivo*, mientras las proteínas se encuentran en su ambiente fisiológico, además de que es posible identificar la interacción espacio-temporal de las mismas. De esta manera es posible extraer mucha más información acerca de la dinámica que existe en la transducción de la señal a este nivel particular de la vía dentro de la célula.

Por último, como un objetivo adicional, se planteó el determinar si la levadura *K. lactis* es capaz de responder al estrés hiperosmótico acumulando glicerol y si los fenotipos viables de las cepas carentes de Sln1p y Ypd1p tienen que ver con esta

respuesta. En concreto, se pretende determinar si la viabilidad de las cepas mutantes ya mencionadas se debe a que no hay una acumulación de glicerol desmedida como sucede en *S. cerevisiae*.

Materiales y metodos.

Cepas y Plásmidos

La cepa bacteriana utilizada para la transformación de plásmidos fue la de *Escherichia coli* DH5 α (ϕ 80 Δ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*).

La cepa de levadura utilizada para la transformación de plásmidos y para el ensayo de doble híbrido fue la de *S. cerevisiae* EGY48 (*MATa*, *ura3*, *his3*, *trp1*, *LexADP-leu2*).

El plásmido en el cual se clonaron los genes y las construcciones recombinantes para su preservación en bacteria fue el pGEM-T Easy Vector de la marca Promega. (Figura 3).

Los plásmidos que se utilizaron para el ensayo de doble híbrido fueron el pEG202, el pJG4-5 y el pSH18-34, siendo los dos primeros los plásmidos que contienen el dominio de unión a ADN y el dominio de activación, respectivamente, mientras que el último contiene al gen reportero.

Los plásmidos que se utilizaron para el ensayo de BiFC fueron el pSAL-2 y el pYES, los cuales son plásmidos inducibles para la levadura *S. cerevisiae*, bajo promotores que responden a la presencia de cobre y galactosa, respectivamente .

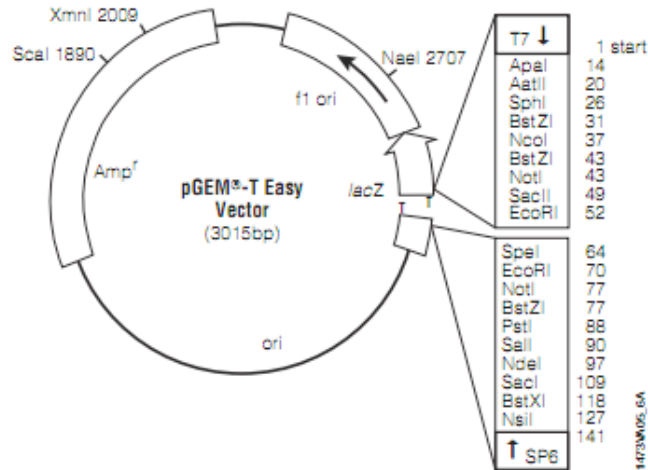
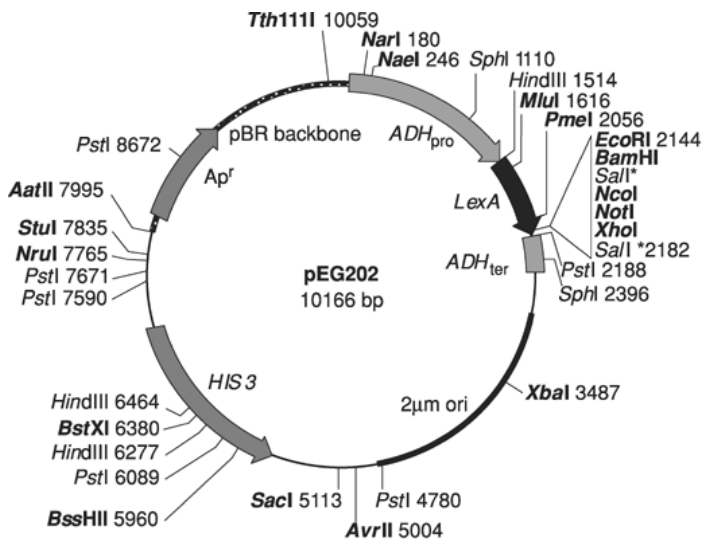


Figura 7. Mapa del plásmido pGEM-T Easy Vector proporcionado por el fabricante. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia del ADN blanco.



Polylinker sequence

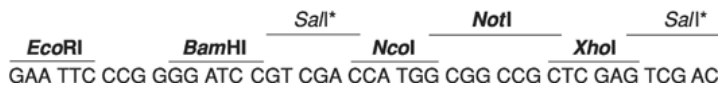


Figura 8. Mapa del plásmido pEG202. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia del ADN blanco.

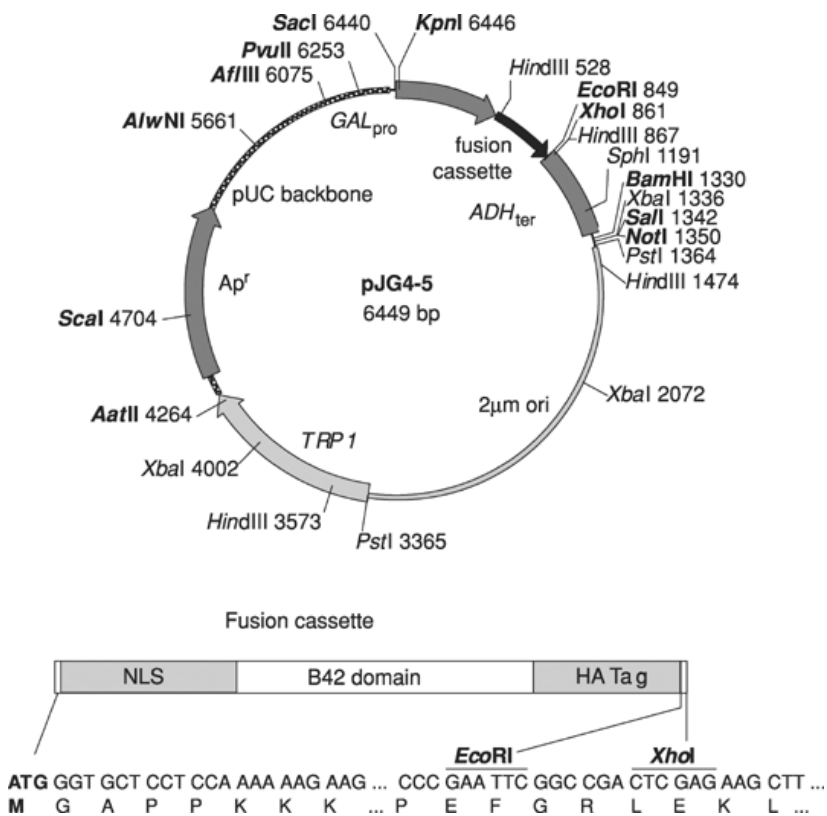


Figura 9. Mapa del plásmido pJG4-5. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia del ADN blanco.

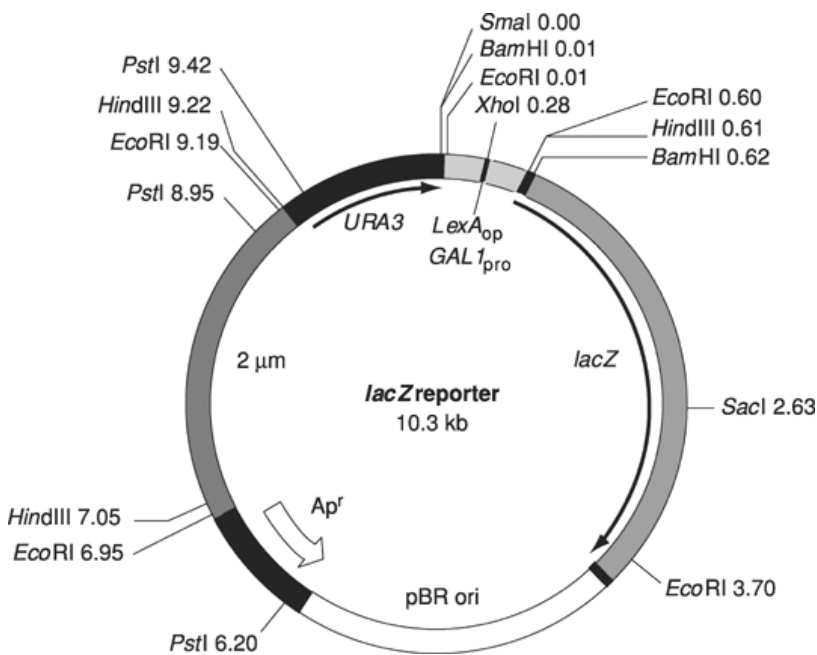


Figura 10. Mapa del plásmido pSH18-34. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector.

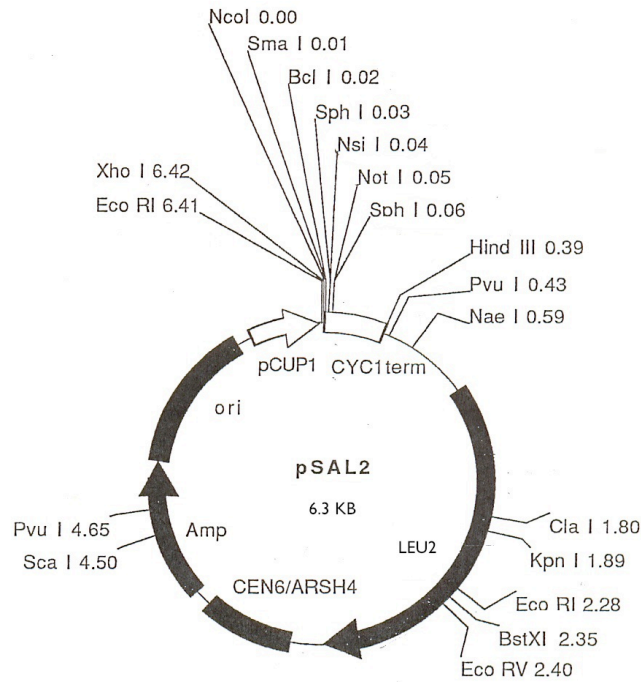


Figura 11. Mapa del plásmido pSAL-2. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia del ADN blanco.

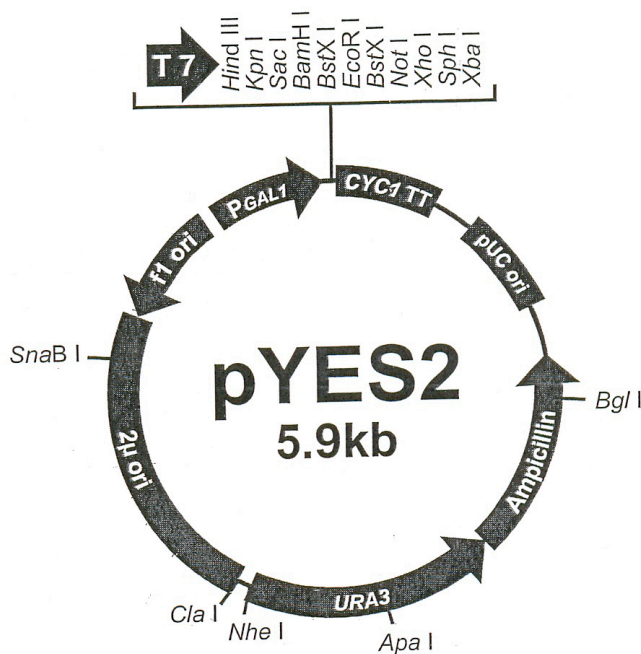


Figura 12. Mapa del plásmido pYES. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia del ADN blanco.

Medios de cultivo, soluciones de antibioticos y aminoácidos

Medio LB líquido: Mezclar 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 10 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

Medio LB sólido: Mezclar 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4 °C.

Medio LB-Ampicilina líquido: Mezclar 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, y 10 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos, una vez frío agregar 1 µl del stock de ampicilina 200 mg/ml por cada 1 ml de medio.

Medio LB-Ampicilina sólido: Mezclar 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar en 1000 ml de agua destilada, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos, esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50°C (cuando se pueda tomar con la mano soportablemente) y agregar 1 µl del stock de ampicilina 200 mg/ml por cada 1 ml de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4 °C.

Medio LB IPTG X-Gal sólido: Mezclar 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar en 1000 ml de agua destilada, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos, esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50 °C (cuando se pueda tomar con la mano soportablemente) y agregar 1 µl del stock de ampicilina 200 mg/ml por cada 1 ml de medio, 350 µl de IPTG por cada 250 mL de medio y 750 µl del stock de X-Gal por cada 250 mL de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4 °C.

Medio YPD líquido: Mezclar 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

Medio YPD sólido: Mezclar 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de dextrosa y 20 g de agar en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4 °C.

Medio SD sólido: Mezclar 0.67 g de YNB, 2 g de dextrosa y 2 g de agar en 100 ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50 °C (cuando se pueda tomar con la mano soportablemente) y agregar 1 ml de aminoácido por cada 100 ml de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4 °C.

Ampicilina 200 mg/ml: Diluir ampicilina sólida en agua Milli-Q estéril, se esteriliza por filtración mediante un filtro con tamaño de poro de 0,2 µm y se almacena a -20 °C en volúmenes pequeños.

IPTG 1M: Disolver 238 mg de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside en 1 ml de agua destilada estéril y se almacena a -20°C.

X-Gal 20 mg/ml: Pesar 20 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactósido (X-Gal) por cada ml de N,N'-dimetil-formamida, disolver y se almacenar a -20 °C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

Adenina 40 mg/l (100X): Pesar 200 mg de hemisulfato de adenina, disolver en 30 ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos y aforar a 50 ml agregando agua estéril.

Histidina 20 mg/l (100X): 100 mg de L- Histidina, disolver en 30 ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos y aforar a 50 ml agregando agua estéril.

Triptófano 20 mg/l (100X): Pesar 100 mg de L- Triptófano, disolver en 30 ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos y aforar a 50 ml agregando agua estéril.

Leucina 90 mg/l (100X): Pesar 450 mg de L- Leucina, disolver en 30 ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos y aforar a 50 ml agregando agua estéril.

Uracilo 20 mg/l (100X): Pesar 100 mg de uracilo, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121 °C durante 30 minutos y aforar a 50 ml agregando agua estéril.

Amortiguadores

Buffer TBE 5X (Tris/Borato/EDTA): Mezclar 53g de Tris Base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.5M a pH 8 en 1 L de agua destilada.

Reacciones de amplificación

Para las reacciones de amplificación en cadena (PCR) se utilizó un termociclador convencional de tapa caliente y se utilizaron dos enzimas, la TaqDNA polimerasa de Invitrogen a 5U/μl y la Platinum Pfx polimerasa, también de Invitrogen, a 2.5 U/μl. La mezcla de reacción que se utilizó para la Taq polimerasa fue: 5 μl de buffer de TaqDNA polimerasa concentrado 10 veces, 2.8 μl de MgCl₂ 50 mM, 4 μl de dNTPs 2.5 mM c/u, 2.5 μl de Oligo Sentido y 2.5 μl de Oligo Antisentido, cada uno a una concentración de 10 pmolas/μl, 1μl de ADN como templado, 31.7 μl de agua destilada estéril y 0.5 μl de TaqDNA polimerasa. La mezcla de reacción que se utilizó para la Pfx polimerasa fue: 5 μl de buffer de Pfx polimerasa concentrado 10 veces, 1 μl de MgCl₂ 50 mM, 1.5 μl de dNTPs 10 mM c/u, 2.5 μl de Oligo Sentido y 2.5 μl de Oligo Antisentido cada uno a una concentración de 10 pmolas/μl, 1μl de ADN como templado, 36 μl de agua destilada estéril y 0.5 μl de Pfx polimerasa.

Se utilizaron diferentes programas de ciclado para amplificar los productos de Ssk1 (alrededor de 2000 pares de bases) y para los de Ssk2 (4500 pares de bases), con Taq o con Pfx. Además se utilizó una reacción de amplificación pequeña

para fusionar el gen de Ssk1 con el fragmento amino de Venus (alrededor de 2500 pares de bases) y reacciones independientes para amplificar ambos fragmentos de Venus (el amino y el carboxilo de alrededor de 300 pares de bases cada uno).

Los diferentes ciclos utilizados para amplificar con la Taq polimerasa se describen a continuación. Para amplificar Ssk1: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 55 seg a 94 °C, 55 seg a 55 °C, 150 seg a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C. Para amplificar Ssk2: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 55 seg a 94 °C, 55 seg a 50 °C, 240 seg a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C. Para fusionar Ssk1 con el fragmento amino de Venus: 5 min a 94 °C, seguido de 10 ciclos de amplificación 55 seg a 94 °C, 45 seg a 50 °C, 150 seg a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C. Para amplificar los fragmentos de Venus: 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 45 seg a 94 °C, 45 seg a 55 °C, 45 seg a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C. Los diferentes ciclos utilizados para amplificar con la Pfx polimerasa se describen a continuación. Para amplificar Ssk1: 3 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 15 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 150 seg a 68 °C, seguido de 10 min a 68 °C. Para amplificar Ssk2: 3 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 15 seg a 94 °C, 30 seg a 50 °C, 240 seg a 68 °C, seguido de 10 min a 68 °C. Para amplificar los fragmentos de Venus: 3 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación 15 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 45 seg a 68 °C, seguido de 10 min a 68 °C.

Electroforesis de ADN en geles de Agarosa y Acrilamida

Para visualizar fragmentos de ADN de >200 pares de bases se utilizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio; este tipo de gel se corrió a 110 volts durante 30 minutos, voltaje constante. El gel de agarosa se preparó pesando 1 gramo de agarosa y disolviéndolo en 100 ml de buffer TAE con ayuda de un microondas hasta alcanzar una mezcla homogénea.

Purificaciones de productos de PCR

La purificación de los productos obtenidos de las reacciones de amplificación por PCR se realizó utilizando el paquete comercial Qiagen Gel Extraction Kit (50) y siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante.

Remoción de sales y amortiguadores del ADN

- 1.- Agregar 500 μ l de butanol a la muestra y agitar en vortex.
- 2.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos y remover el líquido sin perturbar la pastilla.
- 3.- Agregar 500 μ l de etanol al 100% y agitar en vortex.
- 4.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos y remover el líquido sin perturbar la pastilla.
- 5.- Agregar 500 μ l de etanol al 70% y agitar en vortex.
- 6.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos y remover el líquido sin perturbar la pastilla. Esperar a que el etanol residual se evapore.

Ligaciones

Las ligaciones se efectuaron con ligasa T4 de la marca Roche a 1 U/ μ l, en un baño a 16 °C durante toda la noche agregando diferentes cantidades y proporciones de ADN a ligar. Las reacciones se efectuaron en un volumen total de 20 μ l.

Desfosforilación

Las reacciones de desfosforilación se realizaron con la fosfatasa alcalina de la marca Roche a 1U/ μ l. Se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l utilizando una unidad de enzima por cada microgramo de ADN a desfosforilar. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante un mínimo de dos horas y un máximo de 12 horas.

Digestiones

Las digestiones se efectuaron en un volumen de 50 μ l por cada μ g de ADN a digerir, utilizando el amortiguador específico para cada enzima y agregando 5 Unidades de enzima por cada microgramo de ADN aproximadamente. La mezcla se realizó con 5 μ l de buffer correspondiente a la enzima concentrada 10 veces, 1 μ l de enzima a una concentración de 5 U/ μ l, 1 μ g de ADN y agua tetradestilada suficiente para llevar la reacción a 50 μ l. Las diferentes reacciones se incubaron a 37 °C durante un mínimo de 2 horas y un máximo de 12 horas.

Transformación de bacterias

1.- Descongelar 100 μ l de células competentes DH5 α por cada transformación

2.- Agregar plásmido o ADN transformante

3.- Incubar 30 minutos en hielo

4.- Dar choque térmico por 90 segundos a 42 °C

5.- Agregar 1ml de medio LB líquido e incubar durante una hora a 37 °C

6.- Centrifugar las células durante 30 segundos a 13000 rpm, decantar el sobrenadante excedente y resuspender en un volumen total de 200 μ l aproximadamente.

7.- Plaquear las células en el medio de selección apropiado

Miniprep de medio sólido

1.- Raspar una buena cantidad de células de un medio de cultivo sólido

2.- Resuspender en 50 μ l de H₂O en tubos eppendorf de 1.5 ml

3.- Resuspender homogéneamente agitando en el vortex

4.- Agregar 300 μ l de TENS

- 5.- Agitar vigorosamente en el vortex durante 5 segundos aproximadamente
- 6.- Agregar 100 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2
- 7.- Agitar vigorosamente en el vortex durante 5 segundos aproximadamente
- 8.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos
- 9.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio
- 10.- Agregar 1 ml de etanol al 100% y agitar vigorosamente en el vortex
- 11.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos
- 12.- Tirar el sobrenadante y eliminar el etanol residual
- 13.- Agregar 0.5 ml de etanol al 70% y agitar vigorosamente en el vortex
- 14.- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos
- 15.- Tirar el sobrenadante y eliminar el etanol residual
- 16.- Resuspender el ADN en 100 μ l de agua destilada estéril.

Transformación de levaduras

- 1.- Inocular la levadura en 10 ml de medio YPD líquido e incubar a 30 °C y 250 rpm durante todo el día o toda la noche.
- 2.- Inocular 50 ml de medio YPD líquido llevándolo a una densidad óptica de 0.2 a 600 nanómetros.
- 3.- Incubar a 30 °C y 250 rpm observando la densidad óptica hasta que alcance un valor de alrededor 0.6 a 600 nanómetros.
- 4.- Centrifugar las células en un tubo falcon estéril de 50 ml a 3000 x g por 5 minutos.
- 5.- Resuspender las células en un volumen original de agua bidestilada estéril para lavar las células y centrifugar de nuevo.

6.- Resuspender las células en 1ml de agua bidestilada estéril y transferirlas a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

7.- Centrifugar a 13000 rpm por un minuto, remover el sobrenadante y lavar con 1ml de TE/LiOAc (hecho fresco a partir de 10XTE pH 7.5 y 10XLiOAc =1.0M Lilac pH7.5).

8.- Resuspender las células en 1/100 del volumen del cultivo original con TE/Lilac

9.- Mezclar 50 μ l de células con 1 μ g de plásmido y 50 μ g de ADN de esperma de salmón sonicado y hervido

10.- Agregar 300 μ l de 40% PEG/Li/TE (hecho fresco con 1 volumen de 10XTE, 1 volumen de 10XLiOAc y 8 volúmenes de PEG4000 o 3350 al 50%)

11.- Mezclar vigorosamente

12.- Incubar la mezcla a 30 °C por 30 minutos y 250 rpm

13.- Agregar 40 μ l de DMSO y mezclar vigorosamente

14.- Dar choque térmico a 42 °C durante 15 minutos

15.- Dar un centrifugado rápido durante cinco segundos y eliminar todo el sobrenadante

16.- Resuspender las células en 1 ml de agua destilada estéril

17.- Dar un centrifugado rápido durante cinco segundos y eliminar todo el sobrenadante

18.- Resuspender en un volumen aproximado de 200 μ l y plaquear en el medio de selección apropiado.

Inducción de los plásmidos recombinantes y obtención de imágenes de epifluorescencia.

Las células transformadas se recuperaron y crecieron en un precultivo con medio mínimo SD, que contiene glucosa como fuente de carbono y que además fue suplementado con los aminoácidos correctos para los cuales la cepa es auxotrofa,

las células fueron precultivadas por 12 horas en un volumen de 5 ml, a 30 °C y con agitación constante de 250 rpm. Se determinó la densidad óptica del precultivo a 600nm y se utilizó para generar otro cultivo con un medio inductor, que consiste en un medio mínimo SGal complementado con aminoácidos específicos para los cuales la cepa es auxotrofa. Este medio contiene galactosa como fuente de carbono, la cual funciona como inductor del plásmido pYES, además de 100 µM de CuSO₄ como inductor del plásmido pSAL-2.

El cultivo inductor fue incubado en las mismas condiciones que el precultivo por 4 horas. Por último, las células se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y las células fueron lavadas con 5 ml de agua desionizada estéril, se realizó un segundo centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos nuevamente, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 0.2 ml de agua desionizada estéril. Una vez preparadas las alicuotas para su observación en el microscopio confocal y de epifluorescencia se procedió a agregar KCl a una concentración final aproximada de 1M, de manera que se obtuvieron imágenes en condiciones de osmolaridad normal y en condiciones de estrés hiperosmótico.

Cuantificación de glicerol por método enzimático.

Se cuantificó el contenido de glicerol intracelular de diferentes cepas de levaduras. Estas fueron precultivadas por 12 horas aproximadamente en medio YPD, en un volumen de 5 ml, a 30 °C y con agitación constante de 250 rpm. Se determinó la densidad óptica del precultivo a 600nm y éste se utilizó para generar otros dos de cultivos, ambos en un volumen de 5 ml y una densidad óptica de 0.5 a 600nm.. Uno de ellos consistía en medio YPD exclusivamente y el otro en medio YPD y KCl a una concentración de 0.5 M. Ambos medios se incubaron por 6 horas en las mismas condiciones que el precultivo. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y las células fueron lavadas con 5 ml de agua desionizada estéril, se realizó un segundo centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos nuevamente, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 ml de agua desionizada estéril. Estas fueron sometidas a una

temperatura de 100 °C durante 15 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante resultante fue utilizado para determinar la concentración de glicerol.

Se prepararon las siguientes soluciones para utilizarlas en la reacción enzimática:

Cloruro de Magnesio 1 M.- Disolver 10.16 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en agua desionizada estéril y aforar a 50 ml.

Solución de Glicina/Hidrazina.- Disolver 3 ml de hidrato de hidracina (50% w/v) y 0.75 g de glicina en agua desionizada estéril, agregar 0.1 ml de la solución $MgCl_2$, ajustar el pH a 9.8 con unas gotas de KOH 10 M (libre de glicerol) y aforar a 50 ml.

Adenosin 5'-trifosfato (50 mM).- Disolver 30.25 mg de $ATP-Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ (pureza de 98%) en 0.7 ml de agua desionizada estéril, ajustar a pH 7 con NaOH y aforar a 1 ml.

Nicotinamida-adenina-dinucleótido (β -NAD 20 mM).- Disolver 14.5 mg de NAD^+ en 1 ml de agua desionizada estéril.

Glicerocinasa (GK, 85 kU/l).- La GK cristalina de *Candida mycoderma* disuelta en $(NH_4)_2SO_4$ 3.2 M y estabilizada con 1% de etilenglicol con actividad específica de 85U/mg es aceptable para el ensayo.

Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GDH, 1700 kU/l).- La GDH de músculo de conejo (10 mg/ml) disuelta en $(NH_4)_2SO_4$ 3.2 M con actividad específica de 170 U/mg es aceptable para el ensayo. Si es necesario diluirla, hacerlo en una solución de $(NH_4)_2SO_4$ 2 M. Posteriormente se lleva a cabo la reacción siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 1.

Pipetear sucesivamente en la cubeta de cuarzo para medir la absorbencia en el espectro a 340 nm.		Concentración final en la mezcla de reacción
Glicina/hidracina	0.7 ml	Glicina 137 mM
GDH	0.01 ml	Hidrazina 686mM
ATP	0.025 ml	MgCl ₂ 1.37 mM
NAD	0.025 ml	GDH 17 kU/l
Solución Blanco	0.25 ml	ATP 1.23mM
		NAD ⁺ 0.49mM
		Glycerol 2-15 μM
Mezclar y leer la absorbencia A1, verificar que la lectura sea constante. Posteriormente agregar		
GK	0.01 ml	GK 0.85 kU/l
Mezclar y monitorear el incremento en absorbencia hasta que se obtenga un valor constante y obtener la absorbencia A2. Calcular A1-A2=ΔA y utilizar este valor para calcular la concentración de glicerol.		

Tabla1. Protocolo para medir el glicerol intracelular por el método enzimático descrito en “Methods of Enzymatic Analysis” por H. U. Bergmeyer en 1984

La reacción acoplada de las enzimas provoca la reducción del NAD⁺ a NADH y la acumulación de este producto se sigue en un espectrofotómetro a 334 y/o 340 nm. La diferencia de absorbencia es proporcional a la cantidad de NADH formado y ésta a su vez es proporcional a la concentración de glicerol en la muestra, la cual se calcula siguiendo la siguiente formula:

$$C = [V / \epsilon d v] \Delta A \text{ mmol/l}$$

Donde:

V= Volumen final de la reacción en l

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH a 340nm

d= Distancia que atraviesa el haz de luz en cm

v= Volumen de la muestra blanco de glicerol en l

Sustituyendo tenemos que:

$C = [0.0102 / (6.3)(1)(0.00025)] \Delta A \text{ mmol/l}$ que es igual a $C = 0.648 \Delta A \text{ mmol/l}$
de glicerol en la muestra a 340nm y

$C = [0.0102 / (6.18)(1)(0.00025)] \Delta A \text{ mmol/l}$ que es igual a $C = 0.66 \Delta A \text{ mmol/l}$
de glicerol en la muestra a 334nm.

Resultados

El ensayo de doble híbrido tuvo como objetivo estudiar la interacción entre Ssk1 y Ssk2 de *K. lactis*. Para esto, se utilizó la secuencia silvestre de ambos genes y una versión no fosforilable de Ssk1, la cual tiene una mutación puntual en su secuencia que cambia al asparato aceptor del fosfato por una alanina. En primera instancia se seleccionaron las enzimas de restricción a utilizar para la inserción de nuestros genes de interés (Ssk1, Ssk2 y Ssk1D444A) en los plásmidos de fusión apropiados. Los genes de interés incluyen la versión silvestre y la versión no fosforilable de Ssk1 de *K. lactis* que se insertaron en el plásmido pJG4-5; y la versión silvestre de Ssk2 de *K. lactis* que se insertó en el plásmido pEG202.

Cuando se corroboró que los plásmidos si contenían los insertos adecuados, (véase Apéndice de Resultados para el proceso detallado de su construcción) se purificaron con una miniprep de columna y se transformaron en la levadura EGY48 que es auxótrofa para uracilo, triptófano, histidina y leucina dependiente del promotor LEX. Las levaduras se seleccionaron en un medio carente de los aminoácidos anteriormente mencionados, excepto por la leucina, y posteriormente se replicaron en el medio de inducción SGAL para poder observar la interacción entre las proteínas mediante la coloración azul de los parches por acción de la B-Galactosidasa.

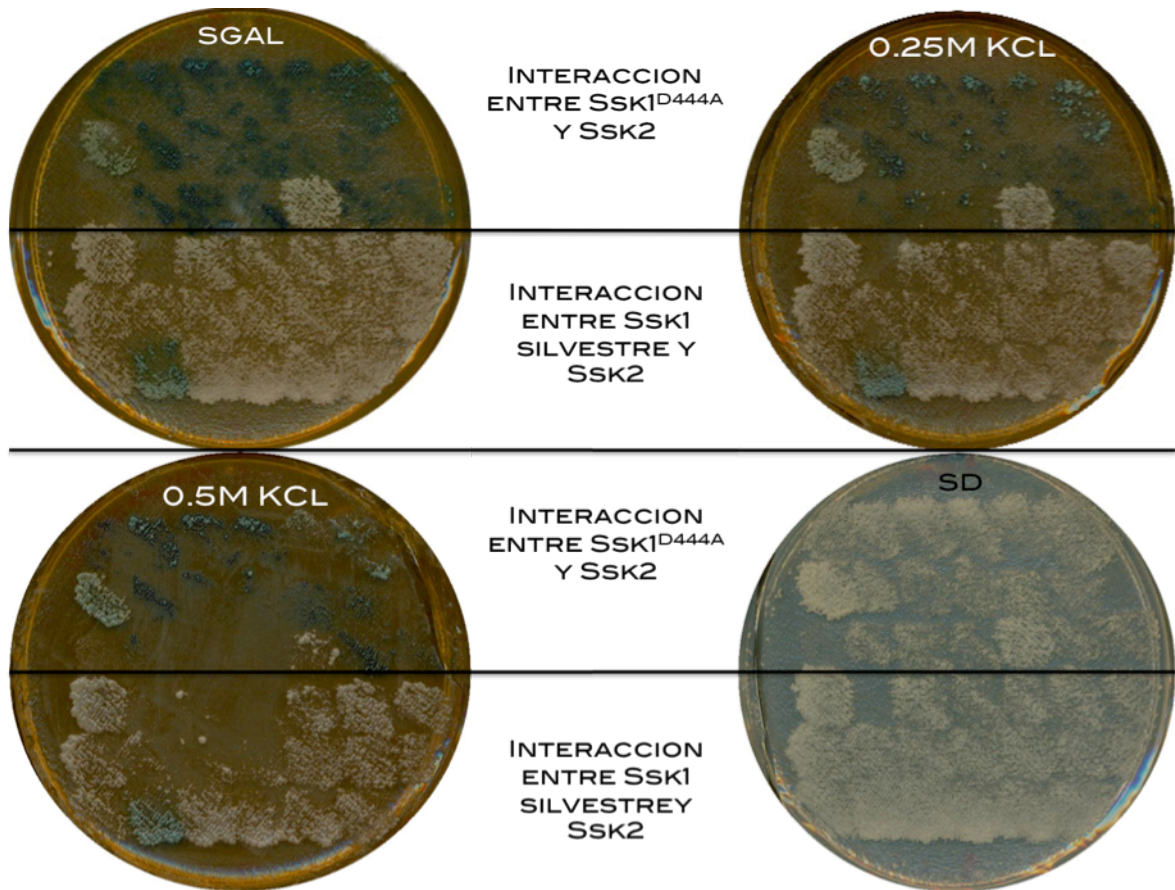


Figura 13. Ensayo de doble híbrido. Los diferentes plásmidos de fusión con los insertos apropiados fueron transformados en la cepa de *S. cerevisiae* EGY148, la cual fue sometida a los diferentes inductores del sistema de doble híbrido para observar la interacción de las proteínas. Se agregaron también concentraciones moderadas de KCl para evaluar si el estrés hiperosmótico era capaz de inducir un cambio en la interacción de las proteínas blanco.

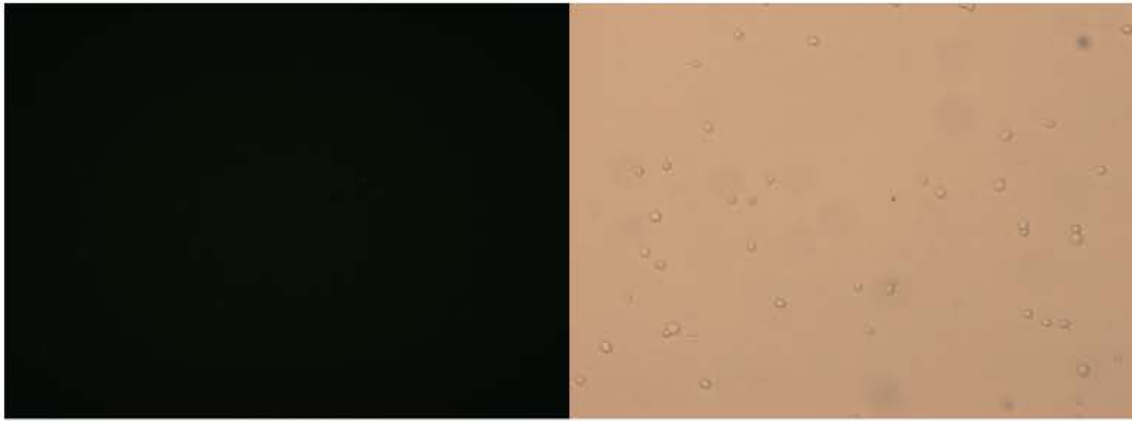
El resultado de este experimento muestra que la forma no fosforilable de Ssk1 interactúa más fuertemente con Ssk2. Esto sugiere fuertemente que la forma activa de Ssk1 es la forma no fosforilada, lo que nos lleva a pensar que el fosforrelevo no funciona de forma contraria a como lo hace en *S. cerevisiae* y que en realidad es muy probable que ambos fosforrelevo funcionen de manera muy similar.

Para el ensayo de fluorescencia por complementación bimolecular, BiFC, se eligieron dos vectores de expresión inducible (pSAL2 y pYES) donde se insertaron las construcciones de los diferentes genes fusionados a cada uno de los fragmentos de la proteína Venus fluorescente para su expresión en *S. cerevisiae*.

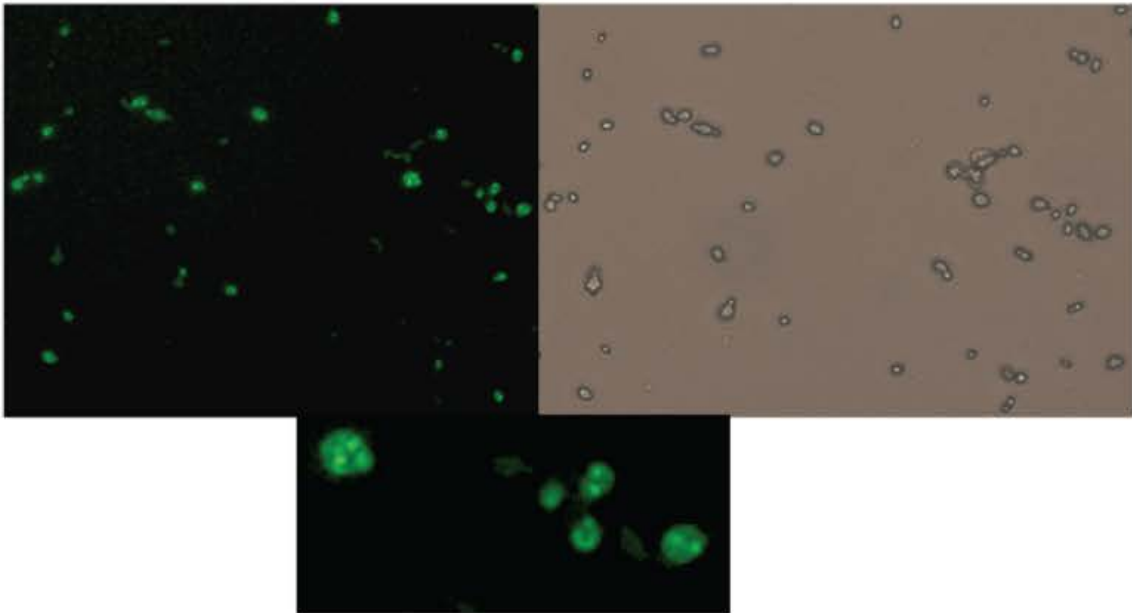
Los plásmidos de expresión que incluían a las construcciones correctas fueron purificados mediante una miniprep de columna y posteriormente fueron transformados en diferentes cepas de levadura la levadura *S. cerevisiae* (véase Apéndice de Resultados para el proceso detallado de su construcción). Se realizaron diferentes transformaciones, todas ellas dobles, en donde se transformaron diferentes juegos de plásmidos en la levadura: los dos plásmidos que codificaban para cada una de las proteínas recombinantes, un plásmido codificante para proteína recombinante y un plásmido vacío y dos plásmidos vacíos.

La cepa de *S. cerevisiae* que nos permitió ver la fluorescencia con mayor intensidad fue la BY-W.T. En ésta se realizaron diferentes ensayos de co-expresión en donde sólo se pudo apreciar fluorescencia de las células en las que se co-expresaron la proteínas NVenusSsk1p (ya sea la forma silvestre o la no fosforilable del regulador de respuesta) y CVenusSsk2p. Se logró apreciar un incremento significativo de la fluorescencia cuando las células fueron sometidas a un estrés hiperosmótico mediante un cambio fuerte de osmolaridad mediante la adición de KCl al medio.

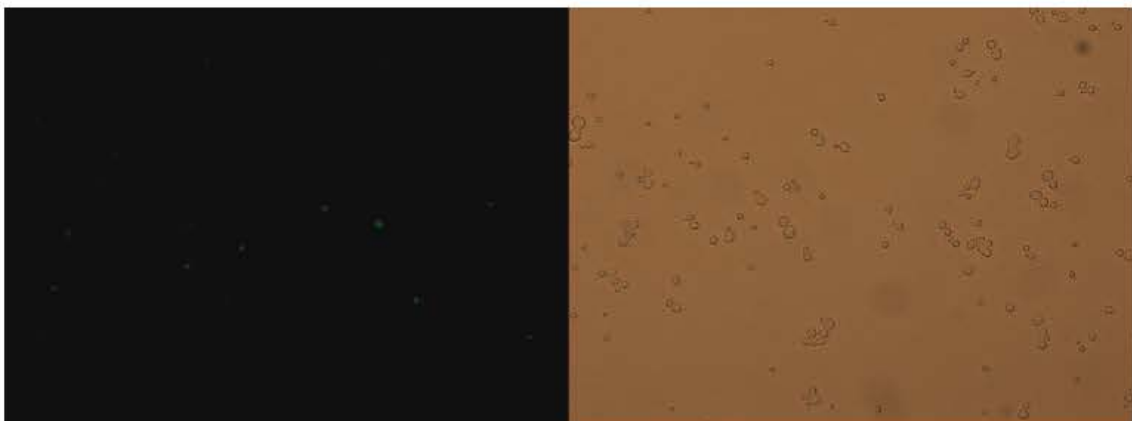
A



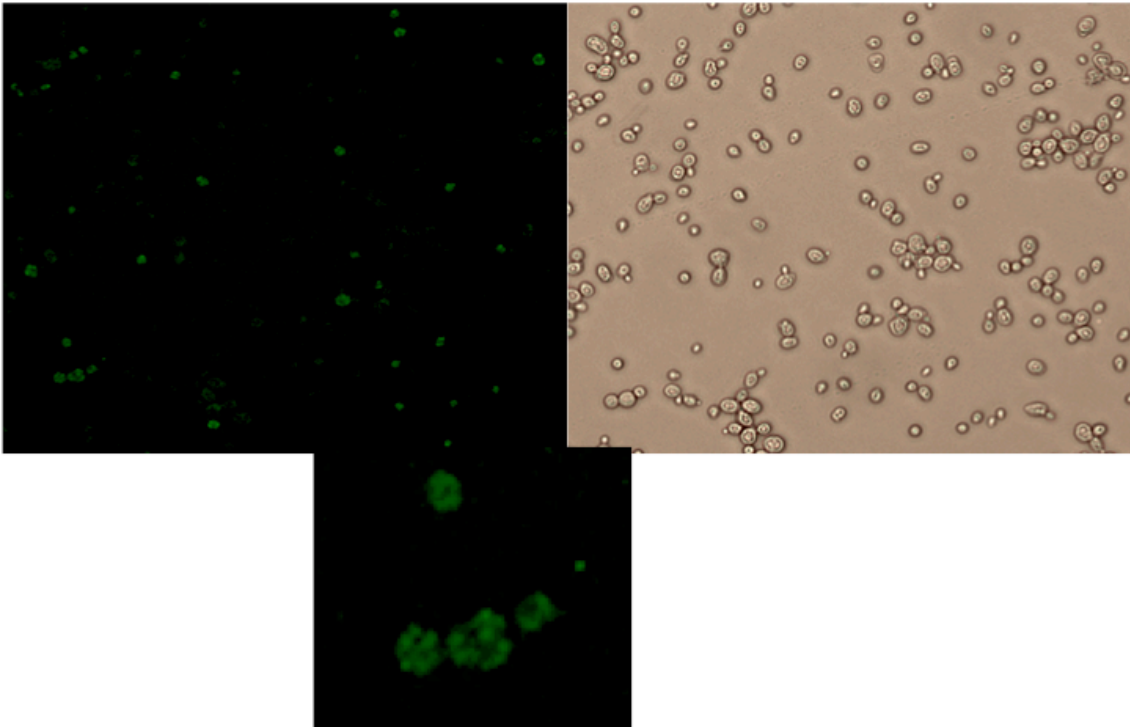
B



C



D



F

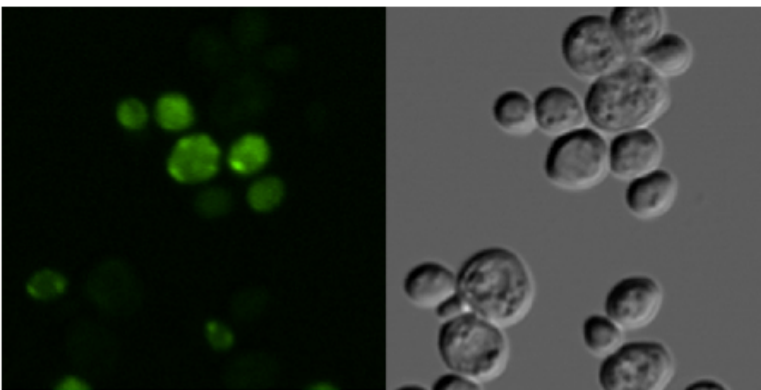


Figura 14. Imágenes de fluorescencia del ensayo de BiFC entre las dos versiones de Ssk1p, y Ssk2p. Una vez transformados los dos plásmidos de expresión en la cepa BY-WT de *S. cerevisiae*, se realizó un precultivo el cual fue transferido a medio inductor -para ambos plásmidos- por 12 horas. A) *S. cerevisiae* BY-WT expresando NVenus-Ssk1 y CVenus-Ssk2 en condiciones de osmolaridad neutra. B) *S. cerevisiae* BY-WT expresando NVenus-Ssk1 y CVenus-Ssk2 en condiciones de hiperosmolaridad -1M KCl- por dos minutos. C) *S. cerevisiae* BY-WT expresando NVenus-Ssk1D444A y CVenus-Ssk2 en condiciones de osmolaridad neutra. D) *S. cerevisiae* BY-WT expresando NVenus-Ssk1D444A y CVenus-Ssk2 en condiciones de hiperosmolaridad -1M KCl-. F) *S. cerevisiae* BY-WT expresando NVenus-Ssk1 y CVenus-Ssk2 en condiciones de hiperosmolaridad -1M KCl- por diez minutos. La imagen representa el promedio de la fluorescencia observada durante la grabación de un video con duración de 5 minutos, el cual se inicio después de 5 minutos de que se dio el shock hiperosmótico a las células. A-D: Imágenes tomadas en el microscopio de epifluorescencia. F: Imagen obtenida con microscopía confocal.

La fluorescencia observada nos indica que las proteínas silvestres de *K. lactis* interactúan fuertemente en condiciones de estrés hiperosmótico, y de forma nula en condiciones de osmolaridad neutra. También se observó que la intensidad de fluorescencia aumenta conforme transcurre el tiempo después de la exposición inicial al KCl. Por otro lado, la versión no fosforilable de Ssk1p interactúa con Ssk2p en condiciones de osmolaridad neutra de forma moderada y fuertemente en condiciones de osmolaridad alta. Se logró observar también puntos discretos en la membrana plasmática con una intensidad de fluorescencia superior al del resto de la célula, indicando la acumulación de las proteínas blanco en complejos proteicos discretos.

En última instancia se quiso determinar si la levadura *Kluyveromyces lactis* responde al estrés hiperosmótico acumulando glicerol intracelular, como ya se ha observado en otras levaduras, y si el fenotipo viable observado en las mutantes carentes de Sln1p y/o Ypd1p se debe a la falta de esta respuesta de acumulación o se debe a que la acumulación de glicerol en esta levadura no es suficiente como para causar su muerte.

Las mediciones de acumulación de glicerol intracelular se realizaron en diferentes cepas de *K. lactis*. Se utilizó una cepa silvestre y mutantes sencillas de dos de los componentes de la rama de Sln1 (Sln1p y Ypd1p) y de la MAPK responsable de activar la vía de estrés hiperosmótico (Hogp) derivadas de dicha cepa silvestre. La determinación de la concentración de glicerol intracelular por gramo de peso seco de las levaduras se hizo tanto en condiciones de osmolaridad neutra como de osmolaridad alta (0.5M KCl). Se realizaron además mediciones en condiciones similares en tres cepas de la levadura *S. cerevisiae*: una silvestre, una mutante sencilla de Hogp y una mutante termosensible de la proteína Sln1. Esta última mutante tiene la propiedad de comportarse como una cepa silvestre a una temperatura permisible (30°C), sin embargo cuando se crece a una temperatura no permisible (37°C) la proteína Sln1 pierde su actividad por completo, lo cual genera una activación constitutiva de la vía de HOG y por ende, la muerte de la célula.

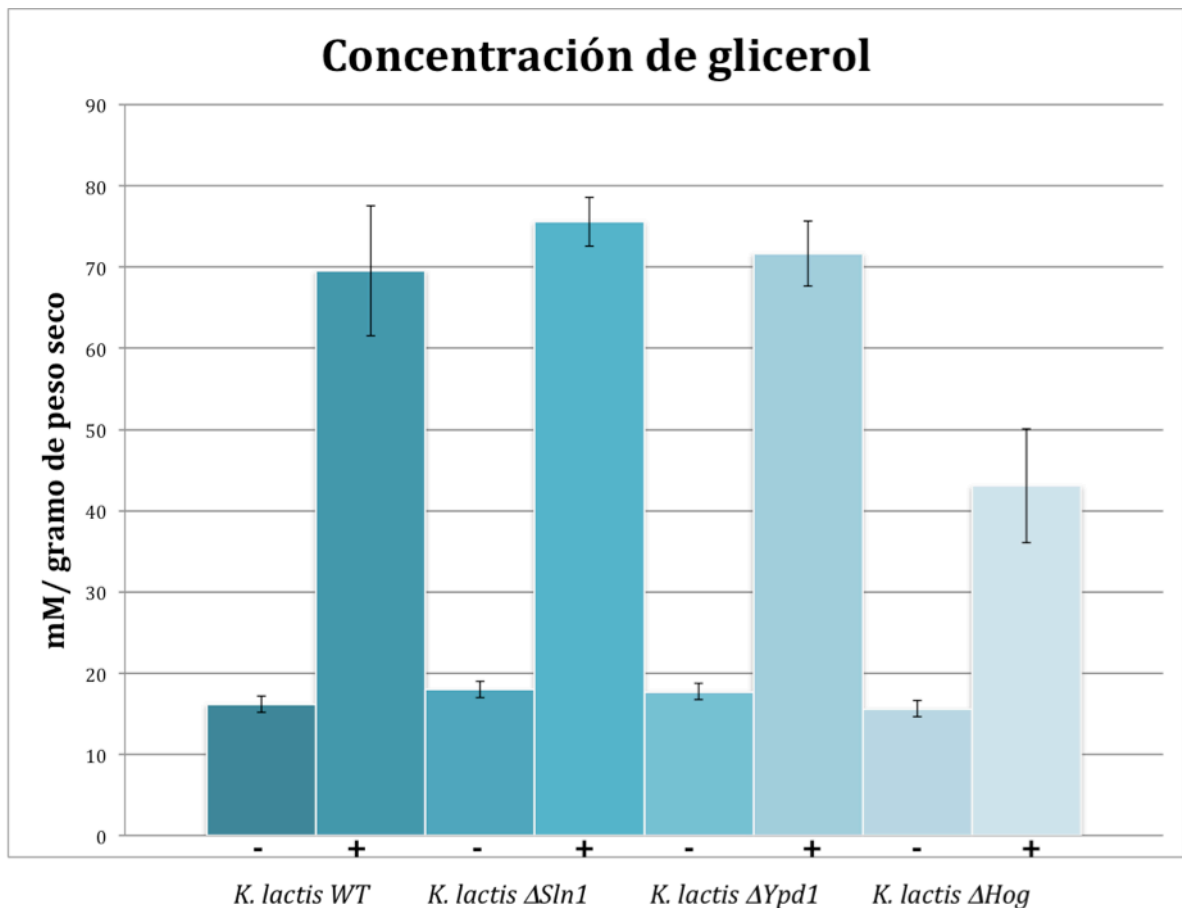


Figura 15. Determinación de la concentración de glicerol en diferentes cepas de *K. lactis*. Diferentes cepas de *K. lactis* fueron precultivadas en medio rico YPD, transferidas a un cultivo que contenía solo medio rico y a otro que contenía medio rico y 0.5M de KCl. Se determinó la concentración de glicerol intracelular de ambos cultivos. El cultivo con osmolaridad neutra está representado por un signo - y el cultivo con alta osmolaridad está representado por un signo +.

Los resultados presentan que *Kluyveromyces lactis* es capaz de responder el estrés hiperosmótico acumulando glicerol en muy bajas cantidades y que las mutantes nulas de la histidina cinasa Sln1p y el acarreador de fosfato Ypd1p no acumulan este osmolito en condiciones de osmolaridad neutra, lo que indica que la ausencia de estas proteínas no provoca la activación constitutiva de la vía de HOG como sucede en otras levaduras. También muestran que la levadura *S. cerevisiae* acumula glicerol en una concentración diez veces mayor que la acumulada por *K. lactis* y además, corroboran el hecho de que la ausencia del fosforrelevo provoca la activación constitutiva de la vía de HOG observada claramente por la acumulación de glicerol en ausencia del estrés hiperosmótico en la mutante termosensible de Sln1.

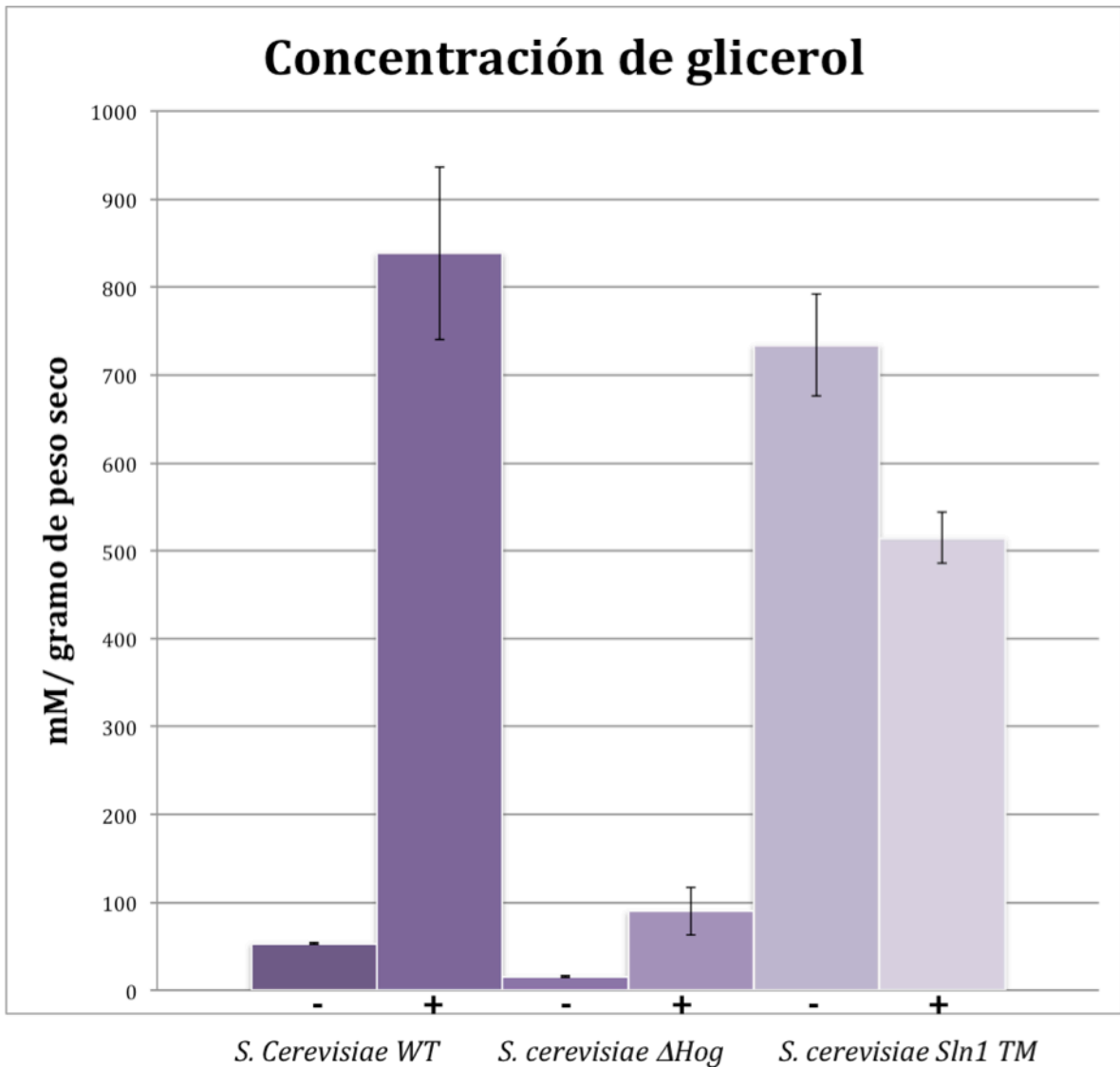


Figura 16. Determinación de la concentración de glicerol en diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Diferentes cepas de *S. cerevisiae* fueron precultivadas en medio rico YPD, transferidas a un cultivo que contenía solo medio rico y a otro que contenía medio rico y 0.5M de KCl. Se determinó la concentración de glicerol intracelular de ambos cultivos. El cultivo con osmolaridad neutra está representado por un signo - y el cultivo con alta osmolaridad está representado por un signo +. La cepa "Sln1TM" fue cultivada a la temperatura no permisiva de 37 °C.

Discusión

El ensayo de doble híbrido nos indica claramente que existe interacción entre las proteínas Ssk1p y Ssk2p de *K. lactis*. Nos indica también que la forma no fosforilable de Ssk1p interactúa más fuertemente con Ssk2p. Esto nos sugiere fuertemente que la forma activa del regulador de respuesta Ssk1p, que puede transmitir la señal de estrés en la vía de HOG, es precisamente la forma desfosforilada. Estos resultados apuntan claramente al hecho de que el fosforrelevo de *K. lactis* es funcionalmente idéntico al de *S. cerevisiae*, y que incluso la interfaz entre el fosforrelevo y el módulo de MAPKs se conserva.

Cabe mencionar que la nula interacción observada entre Ssk1p silvestre y Ssk2p silvestre puede deberse a la formación de un complejo entre el regulador de respuesta Ssk1p de *K. lactis* y el acarreador de fosfato Ypd1p de *S. cerevisiae*, ya que estas proteínas conservan una gran identidad, tanto a nivel de secuencia como a nivel de estructura, en su dominio de fosforilación. Esta identidad es probablemente suficiente para conservar la gran afinidad que existe por la forma fosforilada del regulador de respuesta de parte del acarreador de fosfato, el cual al formar un complejo mediante interacciones en este dominio, estabiliza la forma fosforilada de dicho regulador, aumentando la vida media del grupo fosfato en unas 400 veces. Este mecanismo de estabilización ya ha sido descrito tanto cinética como estructuralmente utilizando los dominios mencionados de las proteínas homólogas de *S. cerevisiae*, y es muy posible que exista entre proteínas de diferentes especies, ya que los dominios tanto de acarreador de fosfato como el de aceptor del fosfato están altamente conservados a nivel de secuencia y de estructura a lo largo de toda la familia de sistemas de dos componentes así como la del fosforrelevo, e incluso se ha observado comunicación cruzada entre proteínas similares de otras especies de bacterias y hongos (12).

Sabemos que la interacción y la estabilización observada entre el acarreador de fosfato Ypd1p y el regulador de respuesta Ssk1p de *S. cerevisiae* ocurre en el citoplasma de la célula. Sin embargo el ensayo de doble híbrido lleva a las proteínas al núcleo mediante una secuencia de internalización intrínseca de los

diferentes dominios del factor transcripcional a los cuales se fusionan las proteínas de interés. La interacción propuesta entre el regulador de respuesta y el acarreador de fosfato sólo sería posible si el acarreador de fosfatos pudiera localizarse en el núcleo, lo cual de hecho sucede. La presencia de Ypd1p en el núcleo ya que se ha demostrado debido a que este acarreador de fosfato cuenta con otro regulador de respuesta blanco en *S. cerevisiae*: Skn7p. Dicho regulador de respuesta sólo se encuentra en el núcleo y se ha comprobado que Ypd1p puede viajar del citosol al núcleo y viceversa para ejercer su regulación en Skn7 (27).

El ensayo de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC) demuestra que, *in vivo*, las proteínas silvestres Ssk1p y Ssk2p interactúan fuertemente sólo en condiciones de estrés hiperosmótico. Aunado a estos resultados junto con los obtenidos en el ensayo híbrido es claro que esta interfaz funciona de forma canónica en cuanto al fosforrelevo, en donde la versión desfosforilada del regulador de respuesta es la forma activa que transmite la señal y que esta forma desfosforilada del regulador de respuesta sólo se presenta en condiciones de estrés. Los resultados también nos permiten confirmar la temporalidad del evento en el que la interacción de las proteínas sucede rápidamente después de que se inicia el estrés y que la interacción de las proteínas no es reversible, lo que provoca su acumulación a través del tiempo antes de ser degradadas.

También se pudo confirmar un fenómeno que otros investigadores ya han observado: la acumulación de las proteínas de la rama en puntos discretos alrededor de la membrana celular, lo cual coincide con hipótesis de la formación de complejos proteicos discretos que incluyen proteínas de las diferentes ramas de respuesta a estrés hiperosmótico (24, 26, 27).

Por otra parte, se observó claramente que la versión no fosforilable de Ssk1p es capaz de interactuar con Ssk2p en condiciones de osmolaridad neutra y que la interacción aumenta en condiciones de osmolaridad alta. Estos resultados indican que aunque este presente una forma no fosforilable del regulador de respuesta, esta no es capaz, por si sola, de generar una interacción con la MAPKKK a un nivel de intensidad similar al que ocurre cuando existe un estrés

hiperosmótico. Esta observación podría ser parte de la explicación detrás de la falta de letalidad observada en una cepa nula para *Snl1p* o *Ypd1p* en *K. lactis*.

Todo indica que en estas mutantes se encuentra presente un regulador de respuesta desfosforilado que es capaz de interactuar con su MAPKKK blanco en condiciones de osmolaridad neutra; sin embargo esta interacción moderada no es funcional de manera que no se activa la respuesta formal por parte de la vía de HOG y es estrictamente necesario que exista un estrés hiperosmótico para que dicha vía se active en *K. lactis*.

Cabe mencionar que el hecho de observar estos resultados mediante la expresión heteróloga de las proteínas sugiere que la regulación de este fenómeno parece depender única y exclusivamente de la dinámica de la interacción que existe entre *Ssk1p* y *Ssk2p*, aunque aún no nos es posible descartar que exista algún otro factor en *K. lactis* que ayude a regular la respuesta de la vía de HOG.

El hecho de corroborar que el fosforrelevo de *K. lactis* sea funcionalmente idéntico al de *S. cerevisiae* refuta nuestra hipótesis inicial, haciendo que sea necesario proponer y encontrar la causa por la que esta levadura es capaz de sobrevivir con un regulador de respuesta constitutivamente desfosforilado.

Una de las posibilidades que podrían explicar el fenotipo observado en *K. lactis* es que el regulador de respuesta *Ssk1p* no se encuentre realmente en la forma desfosforilada en condiciones de osmolaridad normal, lo que evitaría una sobreactivación de la vía. Esto podría lograrse mediante otra proteína que fuera capaz de suplir la función de la histidina cinasa o del acarreador de fosfatos, o incluso si el fosfato pudiera ser transferido directamente de la histidina cinasa al regulador de respuesta sin pasar por el acarreador de fosfato; sin embargo sabemos que esto no sucede porque al eliminar la histidina cinasa se observaría un fenotipo letal, el cual no existe. Por otra parte, en el genoma de *K. lactis* no existen otras proteínas que tengan dominios similares que puedan ser capaces de transferir un fosfato a *Ssk1p*. Por lo que se sabe de sistemas de dos componentes y del sistema de fosforrelevo, aún no se encuentran proteínas que carezcan del dominio de fosforilación conservado y que sean capaces de fosforilar o transferir un grupo fosfato a las proteínas que participan en estos sistemas (22).

Otra posibilidad es que dicha forma desfosforilada de Ssk1, presente en las mutantes, no fuera capaz de sobreactivar a la vía de respuesta a estrés hiperosmótico HOG y que por lo tanto, fuera incapaz de matar a la célula. Esta posibilidad tiene dos vertientes, una en la que no hay activación de la vía en absoluto y otra en la que existe una activación parcial de la vía que no fuera suficiente como para causar letalidad. En ambos casos, nos es posible comprobar si sucede un fenómeno de esta naturaleza al evaluar la respuesta de la célula al estrés hiperosmótico: la acumulación de glicerol.

Diferentes experimentos realizados en el laboratorio nos indican que es altamente probable que *K. lactis* también responda al estrés hiperosmótico mediante la acumulación de glicerol, ya que al activarse la vía de HOG en esta levadura se induce, entre otras cosas, la expresión de una proteína transportadora de glicerol transmembranal (Datos no publicados del laboratorio).

Por esta razón se decidió hacer la cuantificación de glicerol intracelular de las diferentes cepas de *K. lactis*. Los resultados obtenidos demuestran claramente que las mutantes nulas de Sln1p y Ypd1p en *K. lactis* se comportan de forma idéntica a la cepa silvestre: no acumulan glicerol en condiciones de osmolaridad neutra y acumulan concentraciones similares de glicerol a las de la cepa silvestre en condiciones de osmolaridad alta. Por otra parte, los resultados obtenidos para las diferentes cepas de *S. cerevisiae* nos permiten tener un punto de referencia en cuanto a los niveles de glicerol que se pueden acumular en otras levaduras y reforzar la propuesta de la activación constitutiva de la vía de HOG en mutantes nulas de Sln1p, Ypd1p y en las que se encuentre un regulador de respuesta constitutivamente desfosforilado.

En primera instancia se pudo observar que *S. cerevisiae* acumula por lo menos 10 veces más glicerol que *K. lactis* lo cual sugiere que aunque esta segunda levadura es capaz de acumular glicerol en respuesta a un estrés hiperosmótico, la acumulación de dicho osmolito no es la principal forma de respuesta para contender con la deshidratación y es probable que exista la acumulación de otros osmolitos, como la trealosa por ejemplo, o algún otro mecanismo de respuesta diferente.

Independientemente de los niveles absolutos de glicerol acumulados por *K. lactis*, los niveles relativos de su acumulación nos demuestran claramente que en las mutantes nulas de Sln1p y Ypd1p no se puede dar la activación constitutiva de la vía de HOG. Esto sugiere que aunque se encuentre un regulador de respuesta no fosforilado de manera constante, éste no es capaz de translucir la señal si no existe un estrés hiperosmótico, y es por esta razón que las células no presentan un fenotipo letal.

Los resultados en conjunto nos revelan una diferencia significativa en la dinámica de la vía de HOG en *K. lactis*. En esta levadura, también existe un sistema de fosforrelevo que funciona igual que el de otras levaduras y hongos en donde la histidina cinasa esta activa en condiciones carentes de estrés, transfiriendo el fosfato, a través del acarreador de fosfatos, al regulador de respuesta, manteniéndolo en su estado fosforilado, que es el inactivo. En condiciones de estrés, para nuestro caso particular el hiperosmótico, la histidina cinasa deja de transferir el fosfato, lo cual genera un regulador de respuesta desfosforilado, el cual es activo y capaz de interactuar con la MAPKKK para transmitir la señal al módulo siguiente antes de que se active Hog1p y se lleve a cabo la respuesta adecuada. Sin embargo, cuando se eliminan de la célula la histidina cinasa o el acarreador de fosfato, aunque existe de manera constitutiva una forma desfosforilada del regulador de respuesta, ésta no es capaz de activar a la vía de estrés hiperosmótico HOG en condiciones de osmolaridad normal, lo cual representa una diferencia significativa con el fenotipo observado en *S. cerevisiae* que además, muy probablemente implica alguna forma de regulación adicional y desconocida de esta vía en *K. lactis*.

Este mecanismo de regulación adicional es un fenómeno que aún necesita ser descrito y del cual, hasta el momento, no se tiene precedente alguno en el sistema que se está estudiando. Aún no se tienen los datos suficientes para determinar si el punto de regulación está al nivel de la interfase entre el regulador de respuesta y la MAPKK o si se encuentra en algún nivel río abajo de la vía; sin embargo, definir este mecanismo de regulación es parte esencial de las perspectivas del proyecto del laboratorio. Al identificar, describir y entender la dinámica de los participantes de dicho mecanismo de regulación representaría un

gran avance en la generación de información útil para el entendimiento y reconocimiento de los diversos mecanismos que las células utilizan para controlar finamente la transducción de señales en vías de señalización similares.

Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten concluir un par de cosas respecto a la dinámica que existe entre las proteínas Ssk1 y Ssk2 de *K. lactis*:

- a) Existe interacción entre las proteínas Ssk1p y Ssk2p
- b) La forma desfosforilada de Ssk1p interactúa más fuertemente con Ssk2p
- c) La interacción *in vivo* entre estas proteínas sigue una dinámica similar a la descrita en otros sistemas de fosforrelevo. La forma activa de Ssk1p es la forma desfosforilada, y la interacción funcional entre ambas proteínas sucede sólo en condiciones de estrés hiperosmótico.
- d) La forma desfosforilada de Ssk1p es capaz de interactuar moderadamente con Ssk2p en condiciones de osmolaridad neutra *in vivo*; sin embargo la interacción funcional entre ambas proteínas sucede sólo en condiciones de estrés hiperosmótico.
- e) La temporalidad de la interacción y la localización de las proteínas *in vivo* en la respuesta a estrés hiperosmótico es similar a la respuesta descrita en la levadura de la cerveza.
- f) *K. lactis* es capaz de acumular glicerol en bajas cantidades en respuesta al estrés hiperosmótico.
- g) Las mutantes nulas de la histidina cinasa Sln1p y del acarreador de fosfatos Ypd1p en *K. lactis* se comportan de forma idéntica a la cepa silvestre en cuanto se refiere a la acumulación de glicerol tanto en condiciones de osmolaridad neutra como de hiperosmolaridad.
- h) El sistema de fosforrelevo en *K. lactis* es funcionalmente idéntico al de otras levaduras.
- i) La presencia de Ssk1p en su forma desfosforilada de forma constitutiva es insuficiente para activar la vía de HOG en ausencia de un estrés hiperosmótico.

Estos resultados son incompatibles con la hipótesis planteada inicialmente y queda claro que los datos obtenidos son suficientes para refutarla. Sin embargo, aún es necesario identificar el mecanismo que impide que la vía de HOG se active constitutivamente en cepas que presentan únicamente un regulador de respuesta desfosforilado.

Apendice de Resultados

Ensayo de Doble Híbrido

Para realizar el ensayo de doble híbrido se comenzó con un sencillo análisis de restricción, en el cual se determinaron las enzimas apropiadas para insertar nuestros genes de interés en los plásmidos de fusión adecuados y una vez elegidas incluir sus respectivos sitios de restricción en los oligonucleótidos utilizados para amplificar dichos genes. Las enzimas de restricción apropiadas eran las que no tuvieran un sitio de corte interno en la secuencia del gen. Para la inserción de ambas versiones del gen Ssk1 se utilizaron los sitios de corte de las enzimas EcoRI en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3' de la cadena codificante; para la inserción del gen Ssk2 se utilizaron los sitios de restricción correspondientes a la enzima XmaI en el extremo 5' y NotI en el extremo 3' de la cadena codificante. Una vez diseñados los oligonucleótidos se sintetizaron y se utilizaron para amplificar las dos versiones del gen Ssk1 y Ssk2 de *K. lactis*.

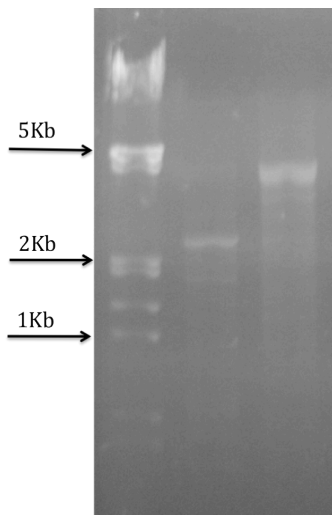
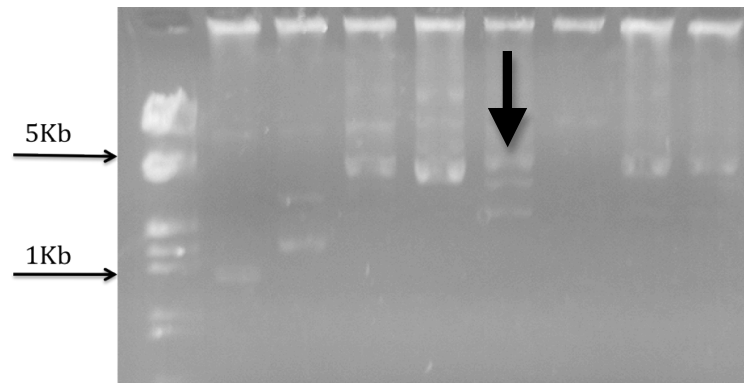


Figura A1. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de los genes Ssk1 y Ssk2 de *K. lactis* amplificados con los oligonucleótidos diseñados para su inserción en los plásmidos de fusión para el ensayo de doble híbrido.

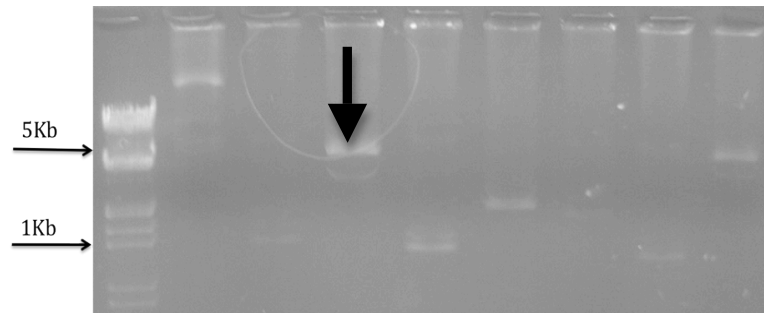
Dichos productos se clonaron en el vector pGEM-T Easy y posteriormente dicho vector se transformó en bacterias DH5. Se realizó una miniprep de medio sólido para identificar las clonas positivas que contuvieran al inserto mediante un ensayo de restricción y una vez confirmadas se realizó una miniprep de columna para poder trabajar limpiamente con el plásmido.

Una vez purificados, tanto los genes como los vectores de fusión se sometieron a dos incubaciones con diferentes enzimas de restricción para generar los extremos pegajosos que permitieron la ligación del gen en fase dentro del vector adecuado. Una vez digeridos, tanto los vectores como los genes se purificaron de un gel de agarosa. Los productos purificados se ligaron entre sí para generar los plásmidos recombinantes y estos plásmidos se transformaron en bacterias para poder comprobar que tenían el inserto mediante un análisis de restricción.

A



B



C

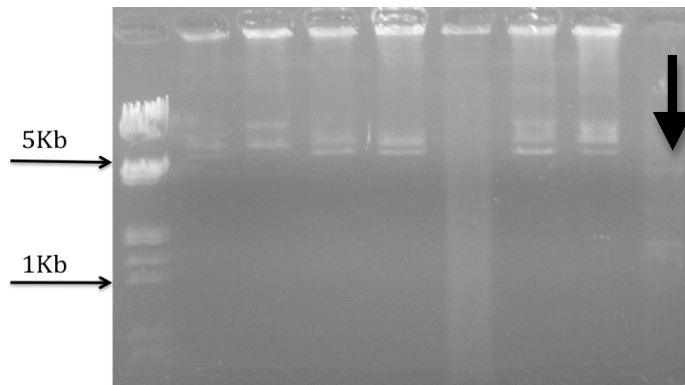


Figura A2. Electroforesis de los plásmidos de clonación pGEM con diferentes insertos obtenidos mediante una miniprep de medio sólido. A) Clonación de KISsk1 en pGEM y verificación por restricción con la enzima EcoRI. B) Clonación de KISsk1D444A en pGEM y verificación por restricción con la enzima EcoRI. C) Clonación de KISsk2 en pGEM y verificación por restricción con la enzima BamHI.

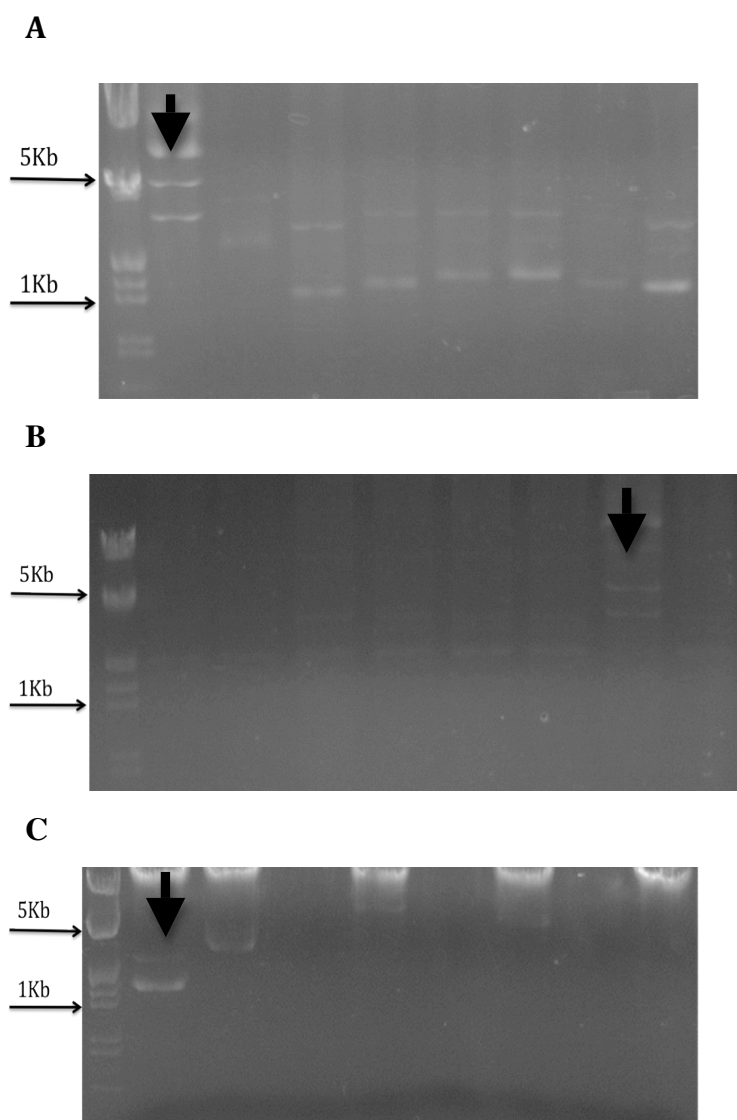


Figura A3. Electroforesis de diferentes plásmidos de fusión para el ensayo de doble híbrido con diferentes insertos, obtenidos mediante una miniprep de medio sólido. A) Clonación de KISsk1 en pJG4-5 y verificación por restricción con la enzima EcoRI. B) Clonación de KISsk1D444A en pJG4-5 y verificación por restricción con la enzima EcoRI. C) Clonación de KISsk2 en pEG202 y verificación por restricción con la enzima BamHI.

Ensayo de BiFC

Para materializar el ensayo de BiFC se comenzó con el diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de Venus y para la amplificación de los genes de interés (Ssk1, Ssk2 y Ssk1D444A), así como para su posterior fusión y su inserción en los plásmidos de expresión.

Para amplificar ambas versiones de Ssk1 se utilizó un oligonucleótido con el sitio de corte correspondiente a la enzima de restricción NotI en el extremo 3' de la cadena codificante, el oligonucleótido utilizado para amplificar a partir del extremo 5' de la cadena codificante fue un oligonucleótido híbrido que incluía parte de la secuencia del extremo amino de Venus y parte del inicio de la secuencia de Ssk1; este oligonucleótido se hizo con el propósito de generar una pequeña región de apareamiento entre las cadenas nucleotídicas de N-Venus y Ssk1 para su posterior fusión. Para amplificar N- Venus se utilizó un oligonucleótido con el sitio de corte correspondiente a la enzima de restricción SmaI en el extremo 5' de la cadena codificante y el mismo oligonucleótido híbrido ya mencionado.

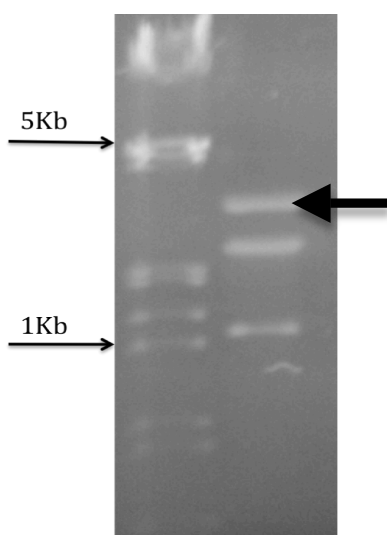


Figura A4. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de la fusión del gen Ssk1 *K. lactis* con el fragmento amino de la proteína fluorescente Venus.

Para amplificar Ssk2 se utilizó un oligonucleótido con el sitio de corte correspondiente a la enzima XmaI en el extremo 5' y uno correspondiente a la enzima XbaI en el extremo 3' de la cadena codificante. Para amplificar el extremo carboxilo de Venus (C-Venus) se utilizó un oligonucleótido con el sitio de corte correspondiente a la enzima SacI en el extremo 5' y uno correspondiente a la enzima XmaI en el extremo 3' de la cadena codificante. Estos dos fragmentos se unieron mediante el corte del sitio XmaI y su posterior ligación gracias a los extremos pegajosos resultantes.

Una vez amplificados los productos de ambas versiones de Ssk1 (Ssk1 y Ssk1D444A) y de N-Venus, éstos se fusionaron en un PCR corto de amplificación en un solo sentido que utilizaba la región de apareamiento antes mencionada entre dichos productos para generar una construcción resultado de amplificación de ambos fragmentos en un solo producto. Esta técnica funcionó adecuadamente para fusionar los productos de Ssk1 y Ssk1A237D con el fragmento amino de la proteína fluorescente Venus y estaba planteada también para generar la fusión de Ssk2 con el extremo C-Venus, sin embargo resultó ineficiente en la práctica, por lo que se tuvo que recurrir a la inserción de nuevos sitios de restricción para, mediante corte y ligación, fusionar el gen de Ssk2 con el fragmento carboxilo de la proteína fluorescente Venus.

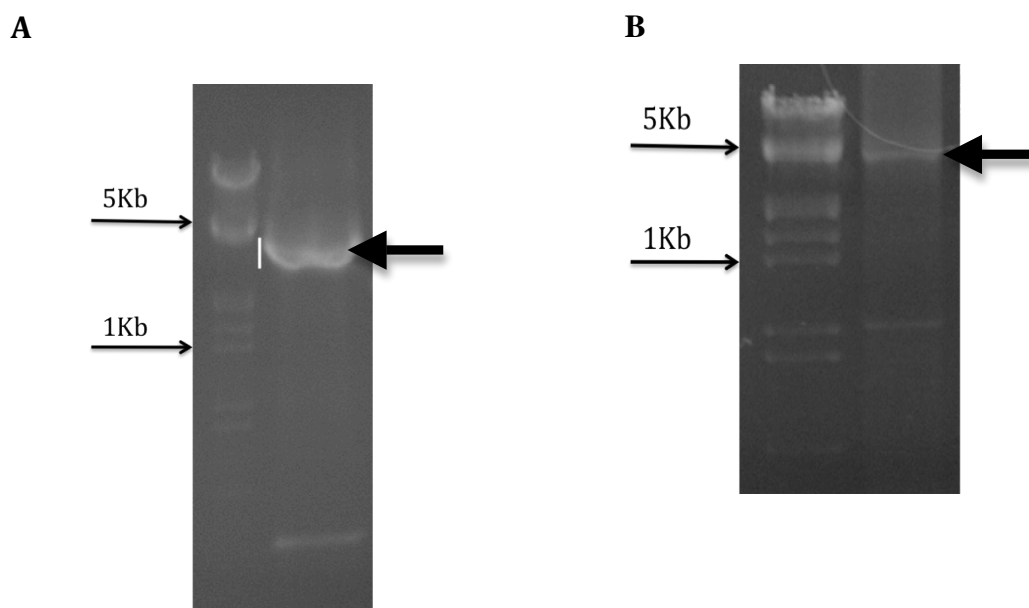
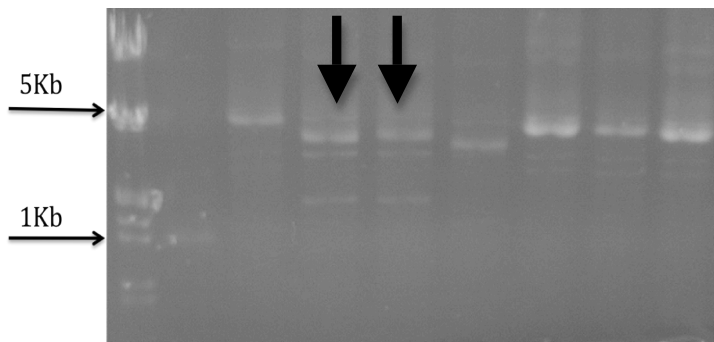


Figura A5. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de diferentes productos de amplificación. A) Amplificación del gen Ssk2. B) Amplificación de la fusión del gen Ssk2 fusionado al fragmento carboxilo de la proteína fluorescente Venus.

Dichos productos fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y posteriormente dicho vector se transformó en bacterias DH5. Se realizó una miniprep de medio sólido para identificar las clonas positivas que contuvieran al inserto mediante un ensayo de restricción y una vez confirmadas se realizó una miniprep de columna para poder trabajar limpiamente con el plásmido.

A



B

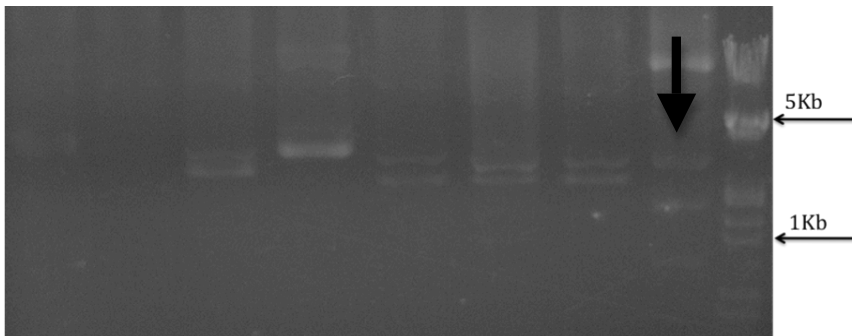


Figura A6. Electroforesis de plásmidos de clonación pGEM con diferentes insertos obtenidos mediante una miniprep de medio sólido. A) Clonación de la fusión N-Venus-Ssk1D444A en pGEM y verificación por restricción con la enzima EcoRI. B) Clonación de la fusión C-Venus-Ssk2 en pGEM y verificación por restricción con la enzima EcoRI.

Una vez purificados, tanto las construcciones como los vectores de expresión fueron sometidos a dos incubaciones con diferentes enzimas de restricción para generar los extremos pegajosos que permitieron la ligación de dichas construcciones dentro del vector adecuado. Una vez digeridos, tanto los vectores como los genes fueron purificados de un gel de agarosa. Los productos purificados fueron ligados entre sí para generar los plásmidos recombinantes y estos plásmidos fueron transformados en bacterias para poder comprobar que tenían el inserto mediante un análisis de restricción.

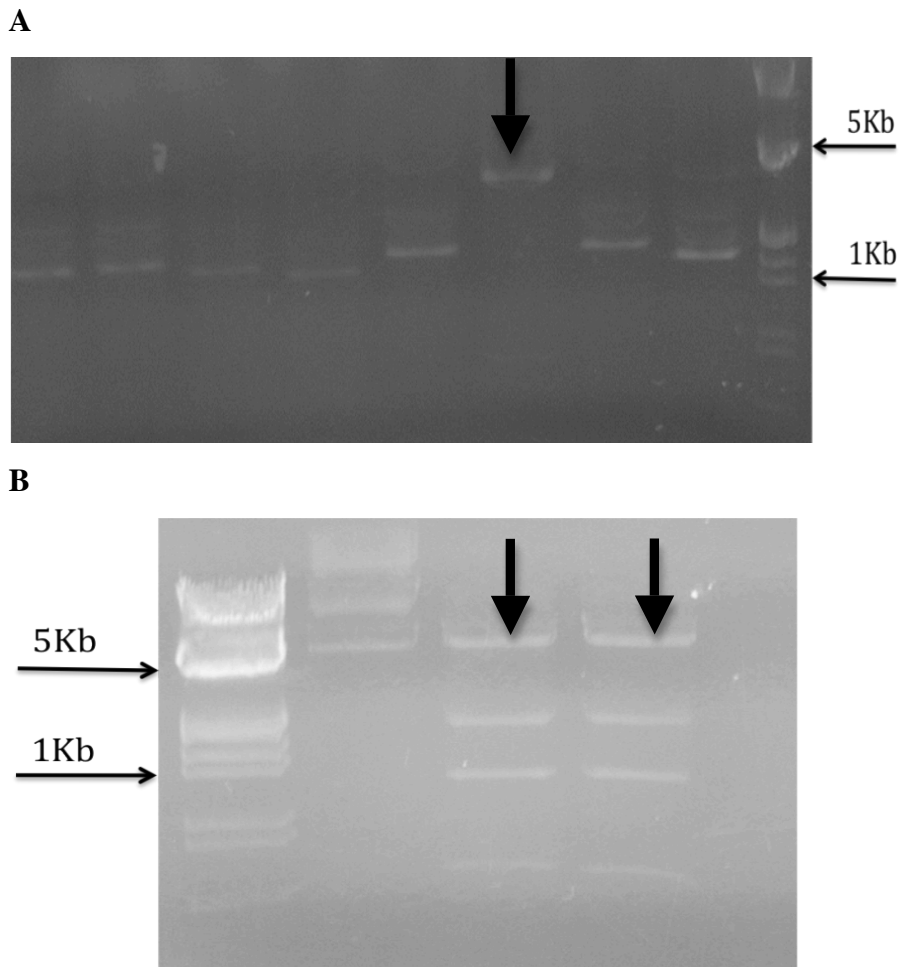


Figura A7. Electroforesis de diferentes plásmidos de expresión para el ensayo de BiFC con diferentes insertos, obtenidos mediante una miniprep de medio sólido y de columna -A y B respectivamente-. A) Clonación de NVenus-Ssk1 en pSAL-2 y verificación por restricción con la enzima ClaI. B) Clonación de Cvenus-Ssk2 en pYES y verificación por restricción con la enzima EcoRI.

Determinación de la concentración de glicerol intracelular

Los resultados obtenidos de las diferentes mediciones de la concentración de glicerol en las diferentes cepas estudiadas se detallan en las tablas siguientes:

K. lactis WT YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	ΔA 334nm	ΔA 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1665	0.1388	0.3018	0.2773	0.1353	0.1385	0.089523	0.0056	15.98625
Ensayo2	0.1636	0.1371	0.3182	0.2934	0.1546	0.1563	0.1016592	0.0062	16.39664516
Ensayo3	0.1616	0.1359	0.3063	0.2818	0.1447	0.1459	0.0950226	0.0059	16.10552542
K. lactis WT YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	ΔA 334nm	ΔA 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1666	0.1362	0.5808	0.5582	0.4142	0.422	0.273414	0.0035	78.11828571
Ensayo2	0.1591	0.1329	0.4683	0.4462	0.3092	0.3133	0.2035452	0.003	67.8484
Ensayo3	0.1736	0.1469	0.5623	0.5438	0.3887	0.3969	0.2568666	0.0041	62.65039024

Tabla A1. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa silvestre de *K. lactis*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm.

K. lactis $\Delta Sln1$ YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	ΔA 334nm	ΔA 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1768	0.1492	0.3018	0.2786	0.125	0.1294	0.0831756	0.0047	17.69693617
Ensayo2	0.1717	0.1478	0.3152	0.2939	0.1435	0.1461	0.0946914	0.0051	18.56694118
Ensayo3	0.1725	0.1459	0.3018	0.2763	0.1293	0.1304	0.0849186	0.0048	17.691375
K. lactis $\Delta Sln1$ YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	ΔA 334nm	ΔA 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1817	0.1538	0.5959	0.5755	0.4142	0.4217	0.2733168	0.0035	78.09051429
Ensayo2	0.1796	0.1505	0.5974	0.5784	0.4178	0.4279	0.2765136	0.0036	76.80933333
Ensayo3	0.1781	0.1525	0.5377	0.5177	0.3596	0.3652	0.2369928	0.0033	71.816

Tabla A2. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa $\Delta Sln1$ de *K. lactis*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm.

K. lactis Δ Ypd1 YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1693	0.1405	0.2808	0.2586	0.1115	0.1181	0.0750594	0.0045	16.67986667
Ensayo2	0.1713	0.1409	0.3116	0.2879	0.1403	0.147	0.093927	0.0049	19.16877551
Ensayo3	0.1628	0.1393	0.2925	0.2754	0.1297	0.1361	0.0868974	0.005	17.37948
K. lactis Δ Ypd1 YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1644	0.1398	0.4794	0.4582	0.315	0.3184	0.2071116	0.0031	66.81019355
Ensayo2	0.1623	0.1365	0.5165	0.4982	0.3542	0.3617	0.2340768	0.0031	75.50864516
Ensayo3	0.1642	0.1373	0.6477	0.6316	0.4835	0.4943	0.3197082	0.0044	72.66095455

Tabla A3. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa Δ Ypd1 de *K. lactis*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm.

K. lactis Δ Hog YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1845	0.1543	0.2981	0.2736	0.1136	0.1193	0.0761412	0.0051	14.92964706
Ensayo2	0.1817	0.155	0.3091	0.2838	0.1274	0.1288	0.0837732	0.005	16.75464
Ensayo3	0.1818	0.1583	0.3235	0.3047	0.1417	0.1464	0.0941946	0.0062	15.19267742
K. lactis Δ Hog YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1882	0.1607	0.3366	0.312	0.1484	0.1513	0.0979932	0.0028	34.99757143
Ensayo2	0.1807	0.1531	0.3418	0.318	0.1611	0.1649	0.1065906	0.0022	48.45027273
Ensayo3	0.1808	0.1514	0.3407	0.3132	0.1599	0.1618	0.1051902	0.0023	45.73486957

Tabla A4. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa Δ Sl α 1 de *K. lactis*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm.

S. cerevisiae WT YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1895	0.1588	0.7057	0.687	0.5162	0.5282	0.3414828	0.0065	52.53581538
Ensayo2	0.1642	0.1408	0.6747	0.6605	0.5105	0.5197	0.3368478	0.0064	52.63246875
Ensayo3	0.1652	0.1415	0.6848	0.6694	0.5196	0.5279	0.3425076	0.0063	54.36628571
S. cerevisiae WT YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1282	0.1087	0.6382	0.6311	0.51	0.5224	3.375576	0.0037	912.3178378
Ensayo2	0.1313	0.1123	0.6346	0.6268	0.5033	0.5145	3.32787	0.0038	875.7552632
Ensayo3	0.1236	0.1051	0.5425	0.5314	0.4189	0.4263	2.763582	0.0038	727.2584211

Tabla A5. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm. Se utilizó una dilución 1/10 del sobrenadante final para calcular la concentración intracelular de glicerol en las células crecidas en condición de hiperosmolaridad.

S. cerevisiae Δ Hog YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1728	0.1457	0.3232	0.3008	0.1504	0.1551	0.0998844	0.0062	16.1103871
Ensayo2	0.1721	0.147	0.3209	0.2997	0.1488	0.1527	0.0985788	0.0065	15.16596923
Ensayo3	0.1711	0.1443	0.295	0.3149	0.1239	0.1706	0.0961614	0.0063	15.26371429
S. cerevisiae Δ Hog YPD 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco

Ensayo1	0.148	0.1274	0.4146	0.3987	0.2666	0.2713	0.1758792	0.003	58.6264
Ensayo2	0.1438	0.122	0.6051	0.5934	0.4613	0.4714	0.3049626	0.0029	105.1595172
Ensayo3	0.144	0.1216	0.5582	0.5781	0.4142	0.4565	0.284592	0.0027	105.4044444

Tabla A6. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa Δ Hog de *S. cerevisiae*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm.

S. cerevisiae Sln1TM YPD	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1298	0.1108	0.3367	0.3225	0.2069	0.2117	1.368678	0.002	684.339
Ensayo2	0.1265	0.1074	0.3317	0.317	0.2052	0.2096	1.356264	0.0017	797.8023529
Ensayo3	0.1297	0.1092	0.3245	0.3109	0.1948	0.2017	1.296348	0.0018	720.1933333
S. cerevisiae Sln1TM 0.5M KCl	A1 334nm	A1 340nm	A2 334nm	A2 340nm	Δ A 334nm	Δ A 340nm	mM Glicerol Promediado	Peso seco (gr)	mM Glicerol/gr de peso seco
Ensayo1	0.1386	0.1187	0.2505	0.2328	0.1119	0.1141	0.738954	0.0014	527.8242857
Ensayo2	0.1352	0.1153	0.248	0.2317	0.1128	0.1164	0.749376	0.0014	535.2685714
Ensayo3	0.1351	0.114	0.2411	0.2288	0.106	0.1148	0.721752	0.0015	481.168

Tabla A7. Determinación del contenido de glicerol intracelular de la cepa Sln1TM de *S. cerevisiae*. Se realizaron tres ensayos independientes para la condición de osmolaridad neutra (YPD) y tres más para la condición de hiperosmolaridad (0.5M KCl). Se determino la concentración de glicerol promediando la concentración obtenida para la diferencia de absorbencia a 334nm y a 340nm. Se utilizó una dilución 1/10 del sobrenadante final para calcular la concentración intracelular de glicerol en todos los ensayos.

Referencias

- 1: Blomberg, A., and L. Adler.** 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **33**:145–212
- 2: Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin.** 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760–1763.
- 3: Brown, A. D.** 1978. Compatible solute and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **17**:181–242.
- 4: Brown, A. D.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**:803–846.
- 5: Brown, A. D.** 1990. *Microbial water stress physiology: principles and perspectives.* J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
- 6: Causton, H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander, and R. A. Young.** 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**:323–337.
- 7: Crowe, J. H., F. A. Hoekstra, and L. M. Crowe.** 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:579–599.
- 8: Folch-Mallol J. L., Covarrubias Robles A. A., Garay-Arroyo A., Lledías F.** 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *RLM.* **46**:24-46.
- 9: Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport.** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1264–1300.
- 10: Hallsworth, J. E.** 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **85**:125–137.
- 11: Hohmann, S., and W. H. Mager.** 1997. *Yeast stress responses.* R. G. Landes Company, Austin, Tex.
- 12: Janiak-Spens, F., D. P. Sparling, and A. H. West.** 2000. Novel role for an HPt domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain. *J. Bacteriol.* **182**:6673–6678.
- 13: Janiak-Spens, F., J. M. Sparling, M. Gurfinkel, and A. H. West.** 1999. Differential stabilities of phosphorylated response regulator domains reflect functional roles of the yeast osmoregulatory SLN1 and SSK1 proteins. *J. Bacteriol.* **181**:411–417.
- 14: Janiak-Spens, F., and A. H. West.** 2000. Functional roles of conserved amino acid residues surrounding the phosphorylatable histidine of the yeast phosphorelay protein YPD1. *Mol. Microbiol.* **37**:136–144.
- 15: Maeda, T., M. Takekawa, and H. Saito.** 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**:554–558.

- 16: Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242–245.
- 17: Piper, P. W.** 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**:121–127.
- 18: Posas, F., and H. Saito.** 1998. Activation of the yeast SSK2 MAPKKK by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* **17**:1385–1394.
- 19: Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito.** 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **86**:865–875.
- 20: Rahman, M. S.** 1999. *Handbook of food preservation.* Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- 21: Ru“benhagen, R., S. Morbach, and R. Krämer.** 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K₊. *EMBO J.* **20**:5412–5420.
- 22: Serrano, R.** 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **165**:1–52.
- 23: Serrano, R., J. A. Márquez, and G. Rios.** 1997. Crucial factors in salt tolerance., p. 147–169. *In* S. Hohmann and W. H. Mager (ed.), *Yeast stress responses.* R. G. Landes, Austin, Tex.
- 24: Stefan Hohmann.** *Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts.* 2002. *MMBR.* **66**:300–372.
- 25: Spencer, J. F. T., and D. M. Spencer.** 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- 26: Stallkamp, I., W. Dowhan, K. Altendorf, and K. Jung.** 1999. Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **172**:295–302.
- 27: Jade Mei-Yeh Lu, Robert J. Deschenes, and Jan S. Fassler** 2003, *Saccharomyces cerevisiae* Histidine Phosphotransferase Ypd1p Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm for *SLN1*-Dependent Phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryotic Cell.* **6**: 1304–1314.