



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

T E S I S

ESTUDIO DE LA FOSFOTRANSFERENCIA EN LA RESPUESTA A  
ESTRÉS OSMÓTICO EN LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

Eunice Alejandra Domínguez Martín

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

MÉXICO, D.F.

JUNIO/2012



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.



*Alice laughed. "There's no use trying," she said: "one can't believe impossible things."  
"I daresay you haven't had much practice," said the Queen. "When I was your age, I always  
did it for half-an-hour a day. Why, sometimes I've believed as many as six impossible  
things before breakfast."*

Through the Looking Glass and what Alice found there, Capítulo 5

Lewis Carroll

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria en el laboratorio 302 oriente, del Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la colaboración del Dr. Roberto Coria, del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo la mayoría de los experimentos reportados en esta tesis.

Se reconoce especialmente la asesoría técnica de la Dra. Laura Kawasaki, quien brindó apoyo para la realización de los experimentos reportados en esta tesis.

Se reconoce también, la colaboración del Dr. Dimitris Georgellis del Departamento de Genética Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de fosfotransferencia. Además, se le agradece la aportación de la proteína purificada ArcBp, la cual fue indispensable para poder realizar los experimentos de este trabajo.

Así como la asesoría técnica de Claudia Rodríguez y Adrián F. Alvarez en el trabajo que realicé en el laboratorio 226 Norte del Instituto de Fisiología Celular.

También se reconoce la asesoría y apoyo de la Dra. Laura Ongay, María Guadalupe Códiz y Minerva Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular; así como de Gerardo Coello de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

La realización de este proyecto fue apoyado por PAPIIT (Proyecto IN-210110), DGAPA y CONACYT (Proyecto 80343).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 8 de junio de 2012.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Antonio Peña	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dra. Rosa Laura Camarena	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Secretario	Dr. Roberto Coria	Instituto de Fisiología Celular
Suplente	Dra. María Eugenia Torres	Facultad de Medicina
Suplente	Dra. Martha Robles	Facultad de Medicina

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda mi familia por su apoyo y cariño. En especial a mi mamá quien me ha guiado y me ha dado su apoyo en todas las decisiones que he tomado, por estar conmigo en todo momento y situación. Le agradezco especialmente que me enseñara con su ejemplo, que todas las metas son posibles, que se pueden lograr todas las que se sueñen, aún si parecen lejanas, diferentes, o incluso imposibles. Le agradezco por ser la médica, escritora, profesora, amiga, guía, esposa, plomera, cocinera, madre, que es todos los días.

A mi papá, pues además de darme su apoyo, ha intentado acercarse a mis intereses y comprenderme. Le agradezco especialmente ser un ejemplo de perseverancia y tenacidad para mí.

A Carlos quien además de quererme como una hija y darme su apoyo, me ha compartido su inmenso conocimiento y ha sido mi profesor de tiempo completo.

A Gudelia, por apoyarme directamente y a través de mi papá. Por mostrarme que se puede ser fuerte ante cualquier adversidad, y ser un modelo de mujer para mí.

Al Dr. Roberto Coria por hacerme parte de este maravilloso equipo de trabajo, el cual camina de forma tan ecuánime e integral gracias a su buena guía. Le agradezco además de todas sus enseñanzas, su confianza y apoyo de mis ideas.

A la Dra. Laurita Kawasaki, por su apoyo incondicional en la parte experimental, y por guiarnos en nuestras ideas y compartir con nosotros su conocimiento. Además de mantener, junto con Maricela, el laboratorio funcionando y ordenado.

A todos los compañeros de laboratorio, que hacen que este laboratorio sea un lugar muy agradable y especial. Algunos siguen dándome su apoyo, y otros compartieron solo un periodo conmigo pero fueron muy importantes: Rocío, Paco, Nancy, Edith, Marcela, Abril, Mariana, Diego, Griselda, Berenice, Natalia y Luis Pablo. En especial a Miriam, que me hizo parte de su proyecto, y a Uriel que me ha dado una amistad especial, además de su apoyo académico y personal. También a mis amigos, en especial a mis compañeros de la licenciatura.

A los miembros de mi jurado: Dr. Antonio Peña, Dra. Rosa Laura Camarena, Dra. María Eugenia Torres y Dra. Martha Robles, por sus comentarios y la revisión de mi trabajo.

A Gerardo Coello, de la Unidad de Cómputo, y Laura Ongay, Lupita y Mine de la Unidad de Biología Molecular. Quienes, aunque no comparten el mismo espacio de trabajo, forman parte de nuestro equipo, y nos dan siempre su apoyo.

A Pablo, de forma especial, pues además de darme su cariño y estar a mi lado, me ha dado enseñanzas tanto académicas, como de vida. Por contagiarme de sus ideales y apoyarme para que logre los míos, y dejarme ser parte de su vida.

ESTUDIO DE LA FOSFOTRANSFERENCIA EN LA RESPUESTA A ESTRÉS  
OSMÓTICO EN LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

INTRODUCCIÓN.....	7
<b>A) Los sistemas de fosforrelevo.....</b>	<b>7</b>
<b>A.1) Los componentes de los sistemas de fosforrelevo .....</b>	<b>7</b>
<b>B) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contiene un sistema de fosforrelevo .....</b>	<b>9</b>
<b>D) El sistema de fosforrelevo en <i>Kluyveromyces lactis</i>.....</b>	<b>15</b>
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVOS.....	20
METODOLOGÍA .....	21
<b>Cepas y medios de cultivo.....</b>	<b>21</b>
<b>Soluciones.....</b>	<b>21</b>
<b>Clonación.....</b>	<b>22</b>
<b>Expresión y purificación de His-KIYpd1p .....</b>	<b>23</b>
<b>Expresión y purificación de Mal-KISsk1p y Mal-KISsk1pD444A .....</b>	<b>24</b>
<b>Ensayos de fosfotransferencia in vitro .....</b>	<b>24</b>
<b>Ensayos de fosfotransferencia a KIYpd1p <i>in-vivo</i>.....</b>	<b>25</b>
RESULTADOS.....	26
<b>Expresión y purificación.....</b>	<b>26</b>
<b>His-KIYpd1p .....</b>	<b>26</b>
<b>Mal-KISsk1rr .....</b>	<b>28</b>
<b>Establecimiento del Sistema in-vitro de Fosfotransferencia.....</b>	<b>31</b>
<b>Fosforilación in-vivo de KIYpd1p en condiciones de iso e hiper-osmolaridad.....</b>	<b>37</b>

DISCUSIÓN .....	41
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	49
APENDICE.....	54
<b>Figura Suplementaria .....</b>	<b>54</b>
<b>Alineamientos de secuencias.....</b>	<b>55</b>
<b>Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín fosfotransferasa KIYpd1p contra la secuencia de aminoácidos de Ypd1p de <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín cinasa KISln1p contra la secuencia de aminoácidos de Sln1p de <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína reguladora de respuesta KISsk1p contra la secuencia de aminoácidos de Ssk1p de <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>57</b>

# INTRODUCCIÓN

Los organismos unicelulares de vida libre suelen estar expuestos a diversos cambios ambientales a los que deben responder y adaptarse de forma rápida y efectiva. Para poder llevar a cabo estas respuestas, las células han desarrollado diversos mecanismos de señalización que les permiten, no sólo sentir qué cambia en su hábitat, sino también transmitir la información al interior de la célula y generar las respuestas necesarias. Dentro de estos sistemas de señalización se encuentran los sistemas de fosforrelevo.

## **A) Los sistemas de fosforrelevo**

Los sistemas de fosforrelevo son un mecanismo celular de señalización en respuesta a diferentes estímulos ambientales, cuya base es la fosfotransferencia entre residuos de histidina y aspartato; estos sistemas se han caracterizado principalmente en organismos procariontes; sin embargo, también existen algunos organismos eucariontes y arqueas que utilizan sistemas de fosforrelevo (Maeda et al., 1994; Chang et al., 1993; Kim & Forst, 2001).

### **A.1) Los componentes de los sistemas de fosforrelevo**

Los sistemas de fosforrelevo están básicamente constituidos por una proteína sensora histidín cinasa (HK por sus siglas en inglés) que se autofosforila ante algún estímulo, y una proteína reguladora de respuesta, que ejerce alguna respuesta celular.

Cuando el sistema sólo contiene un paso de fosfotransferencia, entre la histidín cinasa y uno o varios reguladores de respuesta, se conoce como sistema de dos componentes, y es el más común en procariontes; sin embargo, existen sistemas con múltiples pasos de fosfotransferencia, que pueden encontrarse más comúnmente en organismos eucariontes.

Una histidín cinasa típica suele ser una proteína transmembranal compuesta por varios dominios; uno catalítico de unión a ATP (Tanaka et al., 1998), uno de dimerización, en donde generalmente se encuentra el sitio conservado de fosforilación (una histidina H1) y un dominio sensor que, con sus excepciones, es parte de la misma proteína.

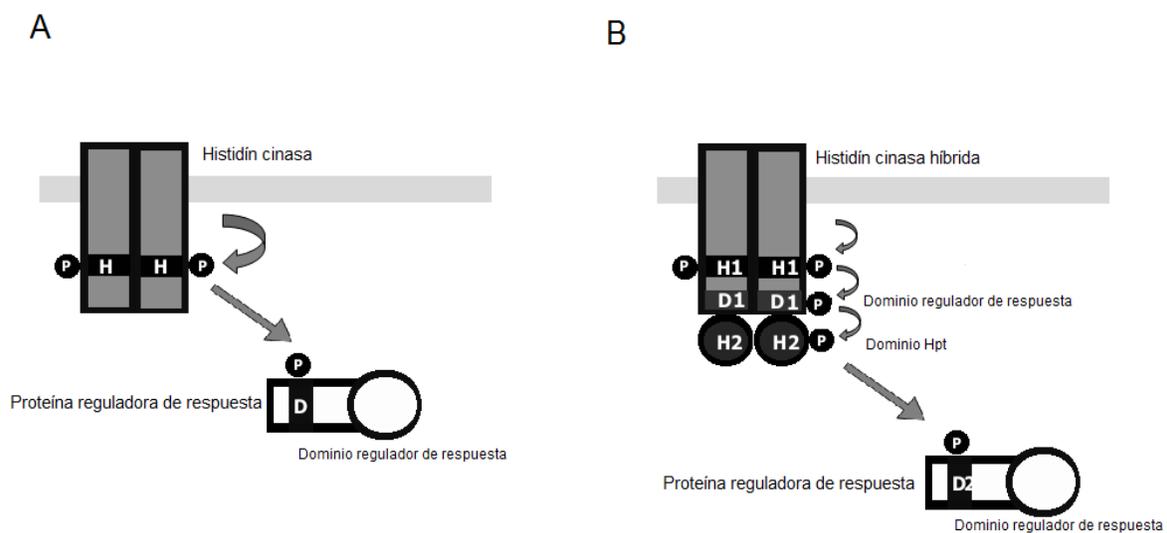
La histidín cinasa es la encargada de monitorear el estímulo y de transmitir la información al interior de la célula. Al detectar un estímulo mediante su dominio sensor, sufre un cambio conformacional, lo cual permite al dominio catalítico efectuar la reacción de autofosforilación. Las histidín cinasas suelen encontrarse en forma de dímeros (Ostrander & Gorman, 1999; Cheung & Hendrickson, 2010), por lo que ésta fosforilación en la histidina (H1) suele ser en trans.

Posteriormente el fosfato se transfiere a un residuo de aspartato (D1) en el dominio regulador de respuesta. Este aspartato D1 suele estar contenido en una proteína distinta, la cual se encarga de disparar una respuesta celular. Existen también histidín cinasas híbridas, que pueden contener dentro de la misma proteína un aspartato D1 aceptor. Algunas de ellas incluso también tienen otra histidina (H2), formándose dentro de ellas un sistema de fosfotransferencia múltiple (H1-D1-H2-D2).

Las proteínas reguladoras de respuesta (RR) suelen estar constituidas por dos dominios, uno regulador N-terminal muy conservado, que contiene el sitio aceptor del fosfato, y otro C-terminal variable que efectúa la respuesta. Estas proteínas catalizan de forma independiente la fosfotransferencia desde la histidina en la cinasa al aspartato en su propio dominio regulador de respuesta (Stock et al., 2000). La forma en que se ejerce la respuesta es muy variada entre sistemas, en muchos casos los RR actúan como factores de transcripción, mientras que en otros, funcionan como enzimas o regulando a otras proteínas. Un sistema de fosforrelevo puede estar constituido por una histidín cinasa y varios reguladores de respuesta.

En algunos casos, los sistemas de fosforrelevo contienen un paso intermedio entre la histidín cinasa y el regulador de respuesta dado por un dominio aceptor de fosfatos que

contiene histidina (Hpt). Éste puede estar contenido dentro de la misma cinasa (como se mencionó anteriormente en el caso de las histidín cinasas híbridas) o en una proteína diferente. Estas proteínas suelen ser pequeñas, y aunque entre especies las secuencias están poco conservadas, se ha observado que comparten una estructura de cuatro hélices (Xu & West, 1999). Las Hpts carecen de actividad de cinasa o fosfatasa, funcionan solamente como módulos de comunicación entre diferentes proteínas, y suele existir solo una Hpt aunque existan varias histidín cinasas y varios reguladores de la respuesta.



**Figura 1. Sistemas de fosforrelevo. A)** En un sistema de fosforrelevo de dos componentes, ante un estímulo, la proteína histidín cinasa se autofosforila y transfiere este fosfato a una proteína reguladora de respuesta, permitiendo que se encienda una respuesta. **B)** En un sistema de fosforrelevo múltiple, después de la autofosforilación de la cinasa, el fosfato es transferido varias veces, ya sea dentro de la misma histidín cinasa (como el caso esquematizado) la cual se conoce como histidín cinasa híbrida, o a otras proteínas.

### **B) *Saccharomyces cerevisiae* contiene un sistema de fosforrelevo**

Los hongos suelen utilizar como sistemas de señalización, además de los módulos de cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinase), sistemas de fosforrelevo. Estos suelen ser más complejos que los de los organismos procariontes, y en algunos casos tienen múltiples histidín cinasas. *Saccharomyces cerevisiae* tiene sólo un sistema de fosforrelevo constituido por una histidín cinasa híbrida, Sln1p (Ota & Varshavsky, 1992; 1993), una proteína Hpt, Ypd1p, y

dos reguladores de respuesta, Ssk1p y Skn7p (Li et al., 1998). Este sistema de fosforrelevo percibe los cambios en la turgencia de la membrana (Reiser et al., 2003), pudiendo regular así respuestas involucradas en mantener la integridad celular. Mediante el regulador de respuesta Ssk1p regula la vía de respuesta al estrés osmótico mediada por la cinasa Hog1p (Posas et al., 1996), mientras que se ha observado que Skn7p está implicado en la biosíntesis de la pared (Brown & Bussey, 1993).

A diferencia de los sistemas de fosforrelevo de los procariontes, los sistemas de los hongos suelen contener histidín cinasas híbridas; tal es el caso de Sln1p, la única HK de *S. cerevisiae* (Ota & Varshavsky, 1993). Sln1p es una proteína de 1220 aminoácidos, que se encuentra anclada a la membrana celular mediante su extremo N-terminal, en el que contiene dos cruces transmembranales separados por un asa extracelular, siendo el primero transmembranal clave para su regulación. En su parte citoplasmática, se encuentran el dominio catalítico y los sitios aceptores de fosfatos (histidina H1 y aspartato D1) (Ostrander & Gorman, 1999).

El sistema de fosforrelevo mantiene un estado basal de fosforilación moderado cuando la levadura se encuentra en condiciones de osmolaridad que permiten su crecimiento. Los cambios en la turgencia de la célula y en la composición de la pared celular ocasionan que la configuración de Sln1p cambie, regulando el acceso de la Histidina 576 al dominio catalítico (Fassler & West, 2010a). Cuando la turgencia de la membrana disminuye, se detiene la fosforilación de Sln1p, y por lo tanto el flujo de fosfatos al resto de los componentes del sistema de fosforrelevo.

Cuando el sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* está activo, el fosfato es transferido del aspartato 1144 de Sln1p a la histidina 64 de la proteína intermediaria Ypd1p; que es pequeña, de 167 aminoácidos, y forma parte de la familia de las proteínas de fosfotransferencia que contienen histidina. Puede localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, siendo esencial su localización en núcleo para poder regular la actividad de Skn7 (Mei-Yeh et al., 2003). Esta proteína presenta un sitio de interacción con el dominio regulador de respuesta al cual se pueden unir los tres dominios reguladores de respuesta

que se encuentran contenidos respectivamente en las proteínas Sln1p, Ssk1p y Skn7p (Porter et al., 2003; West & Porter, 2005) y es capaz de transferir o recibir fosfato desde cualquiera de estos dominios.

Los dos reguladores de respuesta de *S. cerevisiae* son muy diferentes, mientras Skn7p es de localización nuclear obligada y actúa como factor de transcripción, Ssk1p es una proteína citoplasmática que efectúa su función efectora regulando la actividad de las MAPKKK redundantes Ssk2p y Ssk22p, formando parte de una vía de señalización más extensa.

Ssk1p es una proteína de 712 aminoácidos que contiene un dominio regulador de respuesta en su extremo carboxilo terminal. Este dominio resulta esencial para su función, pues además de recibir el fosfato de Ypd1p en su aspartato 427, también es el involucrado en interactuar con Ssk2p/Ssk22p (Posas & Saito, 1998). Esta interacción se puede dar sólo cuando Ssk1p se encuentra defosforilado, y es capaz de estimular la actividad de cinasa de Ssk2p/Ssk22p.

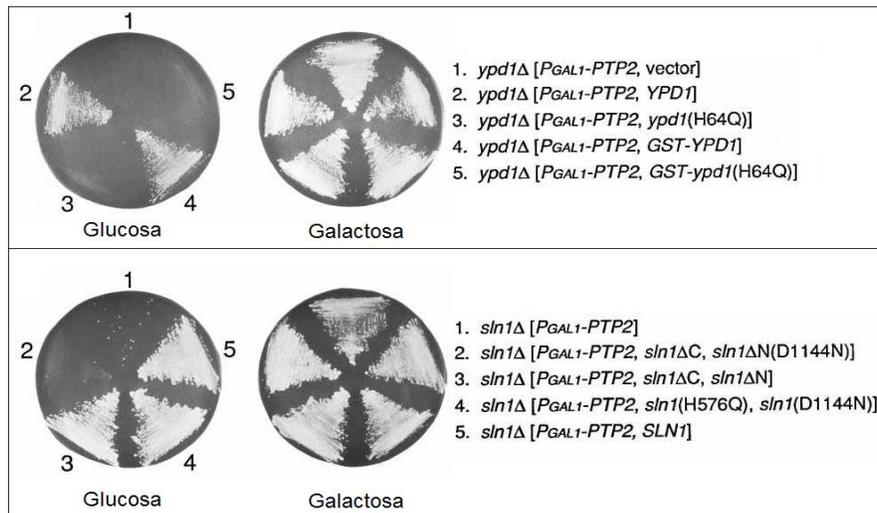
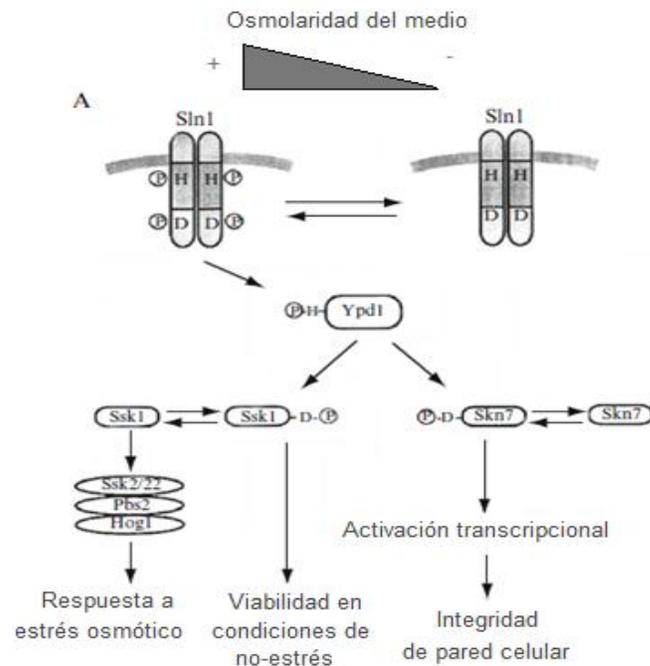
Dado que Ssk1p está implicada en la activación de la vía de HOG, su regulación debe ser muy estricta, debido a que el encendido permanente de esta vía resultaría tóxico para la célula, a tal grado, que las mutantes nulas de Sln1p y Ypd1p resultan letales debido a la activación constitutiva de la vía de HOG (Posas et al., 1996). Para que se dé la interacción con Ssk2p/Ssk22p, debe alcanzarse cierto “umbral” de defosforilación. Ssk1p se encuentra como un homodímero en la célula, y para que este pueda ser activo, ambos dominios reguladores de respuesta deben de estar defosforilados (Horie et al., 2008). Se ha observado también que Ypd1p mantiene muy estable la forma fosforilada de Ssk1p, manteniendo así una vida media de fosforilación de hasta 42 hrs (Janiak-Spens et al., 2000). Aunado a esto, se ha detectado que la forma activa de Ssk1p es más propensa a ser degradada mediante el proteosoma (Sato et al., 2003). Todo esto permite que no sólo se requiera un estímulo de la suficiente magnitud para desplazar el equilibrio hacia la forma totalmente defosforilada, sino que además se pueda apagar eficientemente la respuesta.

Como se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae* existen dos reguladores de respuesta, que además de ser muy diferentes entre sí, parecen jugar papeles antagónicos. Se ha planteado que cuando disminuye la turgencia celular o se afecta la integridad de la pared celular, el sistema de fosforrelevo aumenta su estado de fosforilación. Al aumentar la fosforilación de Skn7p, este puede activar la transcripción de algunos genes involucrados en la remodelación de la pared celular (Sheng Li et al., 2002), y además como consecuencia de esta sobreactivación, la señalización mediante la vía de HOG se ve disminuida (Fassler et al., 1997).

Skn7p tiene un tamaño similar al de Ssk1p (622 AA); sin embargo, está conformada de una forma muy diferente. Esta proteína actúa como factor de transcripción, por lo que tiene, además del dominio regulador de respuesta, un dominio de unión al DNA similar al de los factores de transcripción que responden ante un shock térmico (Hsf por las siglas en inglés de Heat shock factor). Gracias a éste puede causar cambios en la expresión de algunos genes, dependiendo de su estado de fosforilación, pero otra parte de la regulación que ejerce Skn7p es independiente de su estado de fosforilación (Brown et al., 1994). Además, este factor de transcripción está involucrado en regular genes relacionados con la resistencia al estrés oxidativo, pero esta función puede llevarla a cabo aún sin el aspartato 427 que es el que recibe el fosfato de Ypd1p.

### **C) La vía de respuesta al estrés osmótico (vía de HOG) en *Saccharomyces cerevisiae***

La vía de señalización de HOG se encarga de mantener la integridad celular y ayudar a que la célula se adapte al aumento en la osmolaridad del medio. La base de esta vía está constituida por un módulo de MAP cinasas; está regulada río arriba por dos ramas (fig. 3); una de ellas está constituida por el sistema de fosforrelevo descrito anteriormente, y la otra es la rama de Sho1p, que requiere del anclaje a la membrana de esta proteína de andamiaje junto con la actividad de otros componentes, algunos de los cuales comparte con otras vías de señalización.



**Figura 2. El sistema de fosforrelevo de *Saccharomyces cerevisiae*.** Panel superior: Esquema del sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae*. La actividad de Sln1p depende de la osmolaridad en el medio, cuando esta aumenta, se detiene la fosfotransferencia, y Ssk1 puede activar la respuesta al estrés osmótico. Al disminuir la turgencia celular y/o ejercen ciertos tipos de estrés de pared, queda inhibida la actividad de Ssk1p pero Skn7p puede actuar como activador transcripcional (Modificado de Fassler & West, 2010). Panel inferior: Las mutantes nulas o no funcionales de Ypd1p y Sln1p resultan letales en *S. cerevisiae*. Este efecto se debe a la activación sostenida de la MAPK Hog1p. Por este motivo, al expresar bajo el promotor inducible de galactosa la fosfatasa de esta cinasa: PTP2, se revierte el fenotipo letal tanto de  $\Delta$ *sln1*, como de  $\Delta$ *ypd1*. La letalidad se revierte también al expresar al mismo tiempo los fragmentos N y C terminales de la misma proteína por separado (Posas et al., 1996).

La rama de Sho1 activa a la MAPKKK (por las siglas en inglés de cinasa de la cinasa de la MAPK: MAPK Kinase Kinase) Ste11p utilizando como sensores a las mucinas Hkrp1p y Msb2p; para lograr esta activación, también requiere de la actividad de la cinasa Ste20p, que forma parte de la familia de cinasas activadas por p21 (PAK), y de la actividad de andamio/regulador de las proteínas Opy2p y Ste50p (Maeda et al., 1995).

La rama del fosforrelevo activa a las MAPKKKs aparentemente redundantes Ssk2p y Ssk22p mediante Ssk1p no fosforilado. Ambas ramas coinciden en la fosforilación y activación de la MAPKK Pbs2p que a su vez fosforila y activa a la MAPK Hog1p (Brewster et al., 1993).

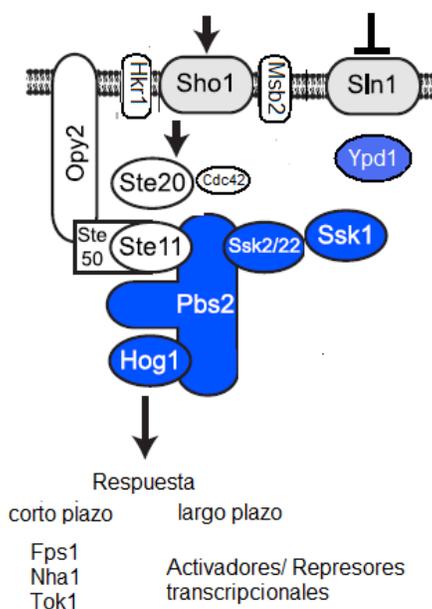
La MAP cinasa Hog1p al activarse induce varias respuestas que contribuyen a una protección a corto y largo plazo. Para contrarrestar los efectos del aumento en la osmolaridad a corto plazo, Hog1p estimula el flujo de iones de sodio al exterior mediante la fosforilación del antiportador Nha1p y del canal de potasio Tok1p (Proft & Struhl, 2004). Otra acción a corto plazo es la regulación de la síntesis y el flujo de glicerol al exterior mediante la fosforilación del canal exportador de glicerol Fps1p (Thorsen et al., 2006).

Hog1p también se transloca al núcleo en donde ejerce parte importante de su actividad en la respuesta a estrés osmótico. Además de controlar la expresión de casi 600 genes (O'Rourke & Herskowitz, 2004), Hog1p previene la progresión del ciclo celular fosforilando a Sic1p. Esta fosforilación parece evitar que esta proteína se degrade y provoque un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Este arresto parece darse no sólo por el aumento de concentración de Sic1p, sino también por una disminución del nivel de ciclinas Cln1p y Cln2p (Escoté et al., 2004).

La acción más importante que ejerce la vía de HOG para mantener la integridad celular ante un aumento en la osmolaridad es la acumulación y la síntesis de glicerol. Para esto, se induce una mayor expresión del simportador glicerol-protón Slt1p (Posas et al., 2000), aumentándose así la importación de glicerol de forma activa del medio. También, se aumenta la expresión de las enzimas glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (codificada por los

genes *GPD1* y *GPD2*) y glicerol-3-fosfatasa (codificada por los genes *GPP1* y *GPP2*) (Rep et al., 1999), aumentando así, la producción intracelular de glicerol. Hog1p controla la expresión de estos y otros genes, modificando la actividad de activadores y represores transcripcionales; ya sea mediante fosforilación, o directamente interactuando con ellos. También, Hog1p promueve la remodelación de la cromatina que permite una mayor transcripción de algunos genes (Proft & Struhl, 2002).

Aumento en la osmolaridad del medio



**Figura 3. La vía de respuesta a estrés osmótico (vía de HOG) en *S. cerevisiae*.** Un aumento en la osmolaridad del medio activa la MAP cinasa Hog1p mediante una vía de MAP cinasas alimentada por dos ramas; la rama de Sho1 y el sistema de fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1. Al activarse por fosforilación, Hog1p ejerce diversas respuestas a corto y largo plazo que respectivamente ayudan a sobrevivir y adaptarse a los efectos ocasionados por una alta osmolaridad en el medio.

#### D) El sistema de fosforrelevo en *Kluyveromyces lactis*

*Kluyveromyces lactis* es un hemiascomiceto que fue descrito por van der Walt en 1971 (van der Walt, 1971 en Kurtzman & Fell, 1998). Existen dos variedades de esta levadura: *var lactis*, que fue aislada de productos que contienen lactosa y es capaz de asimilar lactosa; y *var drosophilorum*, la cual fue aislada de materiales que suelen ser habitados por la mosca *Drosófila* (Kurtzman & Fell, 1998). Además de que es un organismo de fácil manipulación, su genoma está completamente secuenciado (Wolf et al., 2003; Sherman et

al., 2009); esto ha facilitado su estudio, y una comparación más detallada con *S. cerevisiae*.

*K. lactis* presenta, al igual que *S. cerevisiae* dos tipos celulares,  $\alpha$  y  $a$ , que se aparean para formar un diploide, estadio que resulta poco estable, por lo que suele esporular rápidamente.

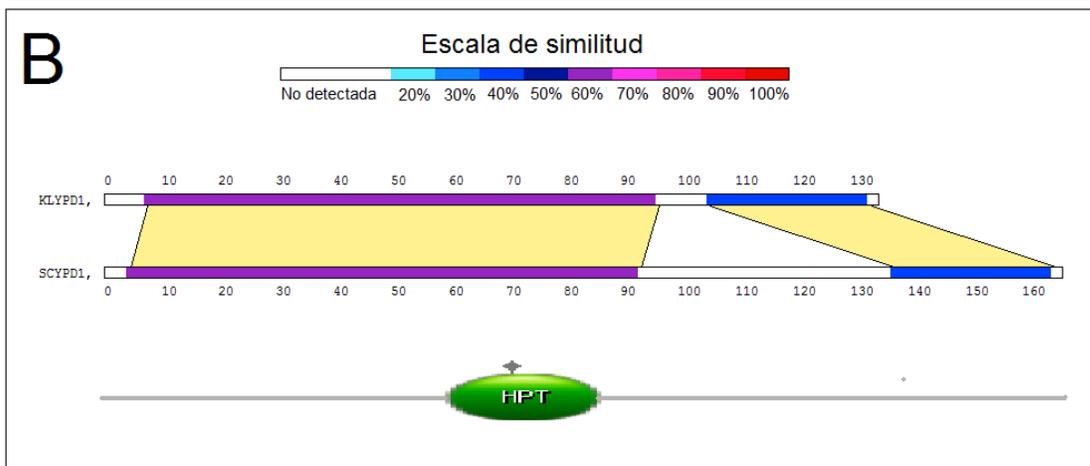
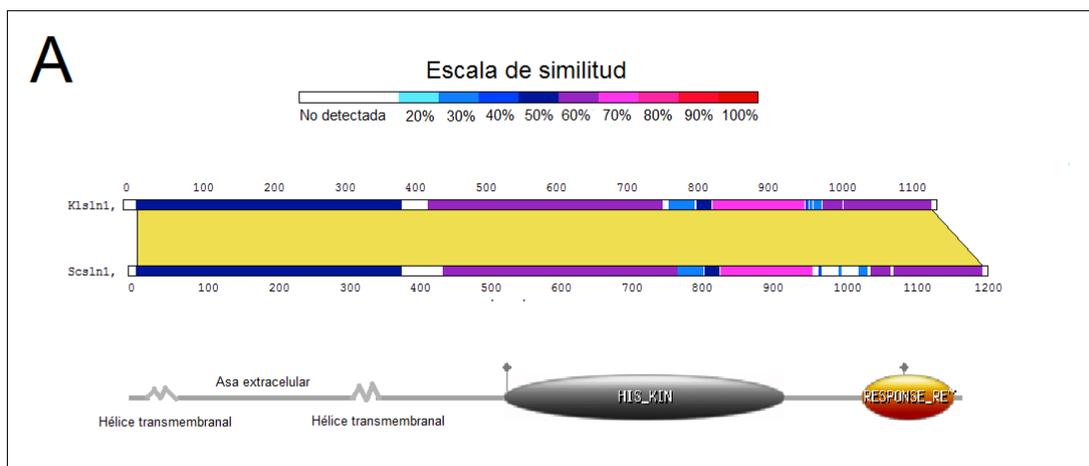
El genoma de esta levadura, que a diferencia de *S. cerevisiae* no proviene de un linaje que haya sufrido duplicación de genoma, tiene aproximadamente 10.6 Mb organizadas en seis cromosomas y puede presentar plásmidos citoplasmáticos

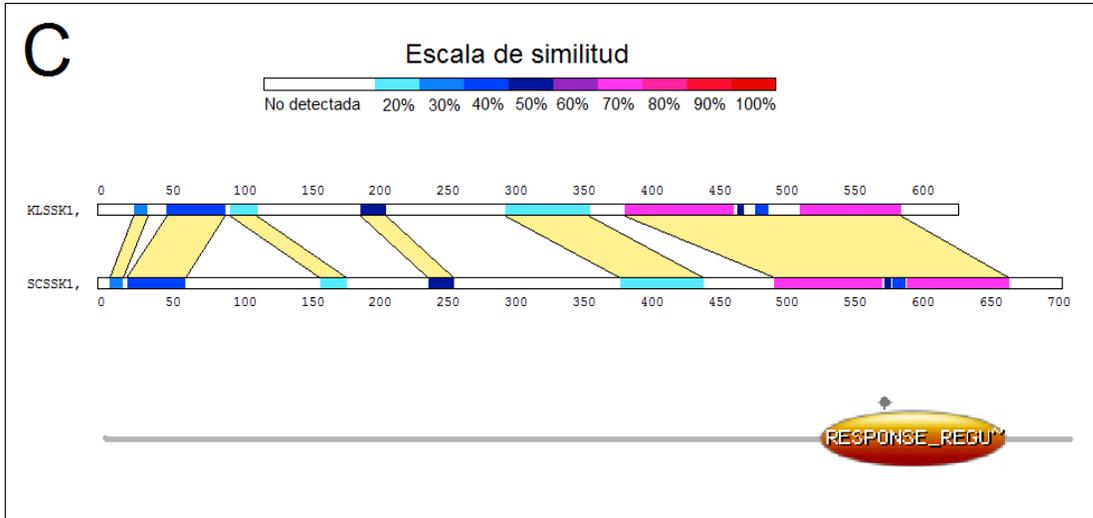
*K. lactis* también se utiliza en aplicaciones biotecnológicas. Principalmente ha sido utilizada para la producción de proteínas heterólogas (Wolf et al., 2003; van Ooyen et al., 2006) debido a su capacidad natural para secretar péptidos que son tóxicos para otras levaduras como *Saccharomyces*, *Candida* y otras *Kluyveromyces* (Wolf et al., 2003; Fukuhara 2003). Es probable que las condiciones que se utilizan para realizar la sobreexpresión de proteínas en este organismo le generen diversos tipos de estrés, por lo que resulta interesante entender cómo funcionan las vías de respuesta a diversos tipos de estrés en esta levadura. Resultando también interesante la comparación de su funcionamiento con el de las vías ya descritas en *S. cerevisiae*.

En la levadura *K. lactis* se han identificado proteínas homólogas a las de la vía de respuesta al estrés osmótico de *S. cerevisiae*: Klpbs2p, Klhog1p (Kawasaki et al., 2008) y Klsho1p (Siderius et al., 2000). Recientemente, en nuestro laboratorio se han identificado también, proteínas que podrían ser homólogas a los componentes del sistema de fosforrelevo.

Klsln1p es una proteína de 1155 aminoácidos que comparte un 55.3% de identidad y un 68.6% de similitud con la histidín cinasa de *S. cerevisiae*; al analizar la secuencia de esta proteína con el programa TMHMM v2 se observa que tiene la capacidad para formar dos hélices transmembranales, además de que el análisis con la herramienta ScanProsite del sitio PROSITE (<http://prosite.expasy.org/> ) predice un dominio de histidín cinasa con un

sitio de unión al ATP similar al de Hsp90 y un dominio regulador de respuesta. La posible Hpt de *K. lactis* (KLYpd1p) comparte un 44.7% de identidad y un 59.4% de similitud con ScYpd1p y por el análisis de su secuencia con ScanProsite parece tener un dominio de Hpt. Mientras la proteína KISsk1p de *K. lactis*, es la probable proteína reguladora de la respuesta, pues además de que tiene una identidad de 30.2% y una similitud de 42.2% con ScSsk1p, al analizarla con ScanProsite, parece contener un dominio regulador de respuesta.





**Figura 4. Representación gráfica de la similitud entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas del sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* y *K. lactis*.** Esta representación se realizó con el programa Lalnview, utilizando alineamientos globales realizados con el programa SIM del servidor ExPASy Proteomic Server (<http://ca.expasy.org/tools/sim-prot.html>), con la matriz EBLOSUM62. En la parte superior se muestra la escala de similitud en colores. Para cada caso se muestra debajo una representación de los dominios que contienen dichas proteínas en el fragmento aproximado en que se encuentra en la proteína: His\_Kin = histidín cinasa, Hpt = dominio de fosfotransferencia que contiene histidina, Response\_Reg = dominio regulador de respuesta; en esta representación, para Sln1p se muestran etiquetados los fragmentos transmembranales y el asa extracelular. **A)** Comparación de las secuencias de Sln1, **B)** Ypd1 y **C)** Ssk1 (Sc = *S. cerevisiae*, Kl = *K. lactis*). Adjuntos se muestran al final de este trabajo los alineamientos completos de las secuencias de aminoácidos de estas tres proteínas.

Se construyeron mutantes nulas de los genes de este posible sistema de fosforrelevo y sorprendentemente, a diferencia de la letalidad generada por la inactivación de Sln1p y Ypd1p en *S. cerevisiae*, en *K. lactis* la delección de estos genes produjo mutantes viables. Se probaron también estas mutantes en ensayos de sensibilidad al estrés osmótico que mostraron un fenotipo ligeramente sensible; sin embargo, es posible que el fenotipo no se pueda observar claramente, dado que la otra rama que alimenta la activación de Hog1 aún está presente. Dadas estas observaciones, es claro que existen importantes diferencias en el funcionamiento de este sistema con respecto al de *S. cerevisiae* que al estudiarse podrían arrojar nuevos datos sobre el funcionamiento de los sistemas de fosforrelevo en eucariontes.

## HIPÓTESIS

Dado que en *K. lactis* el fenotipo de las mutantes nulas de los genes de la única histidín cinasa (KISln1p) y la única histidín fosfotransferasa (KIYpd1p) resultan viables y levemente sensibles a estrés osmótico, es probable que en este organismo la histidín cinasa se active en respuesta a un aumento en la osmolaridad, dándose la fosfotransferencia sólo en condiciones de alta osmolaridad, y siendo entonces el regulador de respuesta fosforilado, el capaz de activar la vía de HOG.

## OBJETIVOS

Probar si las proteínas KIYpd1p y KISsk1p son homólogos funcionales de Ypd1p y Ssk1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

Conocer cómo es la actividad de la histidín cinasa KISln1p frente a un aumento en la osmolaridad.

## METODOLOGÍA

### Cepas y medios de cultivo.

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para la propagación de los plásmidos; se utilizaron, respectivamente, las cepas BL21 y M15 para la sobreexpresión de proteínas. Las cepas DH5 $\alpha$  y M15 se cultivaron en medio LB, y la cepa BL21 en el mismo medio con 2% de glucosa.

Se utilizaron las cepas de *Kluyveromyces lactis*:

WT: 12/8 (MAT $\alpha$  lysA, argA, ura3)

$\Delta$ Klypd1: 12/8 (MAT $\alpha$  lysA, argA)  $\Delta$ klypd1

$\Delta$ Klypd1+YPD1: 12/8 (MAT $\alpha$  lysA, argA)  $\Delta$ Klypd1 [YepKDgal-HIS-KIYPD1]

$\Delta$ Klsln1: 12/8 (MAT $\alpha$  lysA, argA)  $\Delta$ Klsln1

$\Delta$ Klsln1+YPD: 112/8 (MAT $\alpha$  lysA, argA)  $\Delta$ Klsln1 [YepKDgal-HIS-KIYPD1]

Los genes *KIYPD1* Y *KISLN1* se interrumpieron usando el gen *URA3*, y posteriormente se eliminó este marcador, seleccionando clones resistentes a ácido 5- Fluoroorótico.

Para crecer estas cepas se utilizó YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa), YPgal (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% galactosa) y YPgal con baja concentración de fosfatos (YPgal-Pi); de este medio se trató con 0.01M de sulfato de magnesio y 1% de amonio acuoso para precipitar los fosfatos, tal como fue descrito en Warner, 1971.

### Soluciones.

Para la columna de níquel se utilizaron las siguientes soluciones que se prepararon a partir de las soluciones concentradas del kit de purificación de Novagen HisBind (todas a pH 7.9):

Buffer A: 500 mM NaCl, 40mM Tris-HCl, 5 mM imidazol.

Buffer de lavado: 500 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, 60 mM imidazol.

Para la columna de amilosa, se utilizó el Buffer B: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5, para eluir se utilizó el mismo buffer con 10 mM de maltosa.

Buffer de fosforilación 5x: 165 mM HEPES, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50% glicerol, pH 7.5

Buffer de carga 2x: 10%SDS, 0.2 M Tris pH 7.5, 10% glicerol, 0.14 M β-Mercaptoetanol, 0.04 mM de azul de bromofenol.

### **Clonación.**

Se amplificaron mediante PCR y se clonaron los genes *KIYPD1*, *KISSK1* y una mutante puntual *KISSK1*<sup>D444A</sup> (esta mutación se obtuvo previamente en el laboratorio mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Ssk1<sup>D444A</sup>f y Ssk1<sup>D444A</sup>r (tabla 1) a partir de pGEM-*KISSK1*\*). Para amplificar a *KIYPD1* se utilizó el par de oligonucleótidos Ypd1 A y B, y el par Ssk1rrA y B para amplificar la fracción final de *KISSK1* Y *KISSK1*<sup>D444A</sup> (del aminoácido 380 al 635). Como templado sirvieron las construcciones pGEM-*KIYPD1*\*, pGEM-*KISSK1*\*y pGEM-*KISSK1*<sup>D444A</sup>\* respectivamente. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T easy (Promega); se secuenciaron por completo y se subclonaron respectivamente en los plásmidos de expresión pQE30 (Qiagen) y pMAL (New England BioLabs), utilizando los sitios de restricción contenidos en los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar cada gen. En la tabla #2 se muestra un resumen de estas construcciones.

Para realizar la construcción YepKDgal-HIS-*KIYPD1*, se tomó el fragmento XhoI-HindIII de la construcción pQE30-*KIYPD1* y se insertó en el sitio EcoRI-HindIII del fragmento de clonación del plásmido YepKDgal. Se utilizó el fragmento largo de la DNA-polimerasa (Klenow) cuando era necesario obtener extremos romos.

\* Construcciones realizadas previamente por Miriam González.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Ypd1A	AAAAGCACAAGAGCTCATGTCCCAAACA Sacl
Ypd1B	AGAGAAAAGCTTGCCTG HindIII
Ssk1rrA	GGATCCGATAAGCAAGGCAA BamHI
Ssk1rrB	AAATATTCTTGCGGCCGCAAGCTTCTGATGACCAT HindIII
Ssk1D444Af	TTATCCTTATGGCTTTGCAATTG
Ssk1D444Ar	CAATTGCAAAGCCATAAGGATAA

**Tabla 1.** Lista de oligonucleótidos utilizados para realizar este trabajo, se muestran subrayados los sitios de restricción que se utilizaron para poder realizar las construcciones.

Nombre de la construcción	Fragmento clonado
pGEM-KIYPD1*	
pQE30-KIYPD1	
pGEM-KISSK1*	
pGEM-KISSK1 <sup>D444A</sup> *	
pMAL-KISSK1rr	
pMAL-KISSK1 <sup>D444A</sup> rr	
YepKDgal-HIS-KIYPD1	

**Tabla 2.** Lista de construcciones utilizadas en este trabajo en la que se muestran los fragmentos de los genes que contiene cada construcción.

### Expresión y purificación de His-KIYpd1p

Se transformó *E.coli* M15 con la construcción pQE30-KIYPD1. Para la purificación, se creció un cultivo de 100 ml en medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C en

agitación. Cuando este alcanzó una lectura de densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0.5; se adicionó isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se continuó agitando a 37°C durante 4 hrs para inducir la expresión. Posteriormente se centrifugó por 15 mins a 4°C a 5 000 rpm, se retiró por completo el medio y se congeló a -20°C el pellet toda la noche. Se resuspendieron las células en 8 ml de buffer A adicionado con 1% de NP40, se lisaron por sonicación; el lisado se centrifugó a 5000 rpm por 15mins a 4° C y se aplicó a 1ml de resina de níquel (Novagen) previamente lavada, cargada y equilibrada. Se purificó siguiendo el protocolo provisto por dicha compañía. Se eluyó con 100 mM de imidazol en buffer A, en fracciones de 500  $\mu$ l.

### **Expresión y purificación de Mal-KISsk1p y Mal-KISsk1pD444A**

Se transformó *E.coli* BL21 con las construcciones pMAL-*KISSK1rr* y pMAL-*KISSK1rr*<sup>D444A</sup> y se crecieron respectivamente cultivos de 250 ml en medio LB adicionado con glucosa y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina a 37° C, en agitación. Cuando este alcanzó una lectura de densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0.5, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.3 mM y se continuó agitando a 15° C durante 12 hrs para inducir la expresión. Posteriormente se centrifugó por 15 mins a 4° C a 5 000 rpm, se retiró por completo el medio y se congeló a -20° C el pellet toda la noche. Se resuspendieron las células en 20 ml de buffer B, se lisaron por sonicación y el lisado se centrifugó a 5000 RPM por 15 mins a 4° C. Se purificó en columna con la resina de amilosa y se siguió el protocolo provisto por New England con la resina.

### **Ensayos de fosfotransferencia in vitro**

Como se reportó en Azuma et al, se utilizó como histidín cinasa a ArcBp. Se utilizó ArcB en fragmentos; se utilizaron el dominio de histidín cinasa y el dominio aceptor de fosfatos por separado para fosforilar a His-KIYpd1p (H1 y D1). Se verificó la concentración de todas las proteínas purificadas analizándolas mediante SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, se hicieron las diluciones necesarias para que todas las proteínas estuvieran en la misma concentración. Se incubaron a ArcB H1, a ArcB D1 y ATP [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] junto con His-KIYpd1p en

buffer de fosforilación por 10 minutos. Posteriormente se agregó Mal-KISsk1rr o Mal-KISsk1rr<sup>D444A</sup> respectivamente. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 30, 60, 120 y 300 segundos y se mezclaron con buffer de carga para detener la reacción.

Se preparó también fosfo-His-KIYpd1p, incubando la misma reacción que se describió anteriormente, pero con una forma de ArcBp que contiene los dominios de histidín cinasa H1, aspartato aceptor D1 y de fosfotransferencia Hpt pero carece del fragmento transmembranal. Se aplicó a un columna de filtrado con corte de 30 KD, y posteriormente, se realizó la reacción de fosforilación de Mal-KISsk1rr.

Todas las reacciones fueron terminadas por la adición de buffer de carga 2x y analizadas por SDS-PAGE.

#### **Ensayos de fosfotransferencia a KIYpd1p *in-vivo***

Se transformó la construcción YepKDgal-HIS-KIYPD1 en las cepas de *K.lactis*  $\Delta$ Klypd1 y  $\Delta$ KIsIn1. Se buscaron transformantes analizando mediante Western Blot contra la etiqueta de histidinas. Se eligió una clona para cada cepa, y para inducir la expresión de His-KIYpd1p se crecieron las células en un cultivo de 20 ml en YPD hasta que alcanzaron una OD a 600nm de 0.5. Se centrifugaron a baja velocidad, y se retiró este medio y se indujo hasta tener una OD<sub>600</sub> de 0.1 en medio YPgal-Pi, para analizar el estado de fosforilación de His-KIYpd1 en ambas cepas ( $\Delta$ Klypd1+His-KIYPD1 y  $\Delta$ KIsIn1+His-KIYPD1) se siguió un procedimiento similar al descrito en Maeda et al., 1994. Para marcar 1ml de cultivo concentrado a una OD 600 de 10, se utilizaron 0.75 mCi de ortofosfato [P<sup>32</sup>] provisto por Institute of Isotopes Co (10 mCi/ml).

Para producir un shock de estrés osmótico se utilizó NaCl a una concentración final de 400 mM, se incubó durante 5 minutos y se procedió a lavar y lisar las células. Se analizaron los extractos totales mediante SDS-PAGE y mediante Western Blot contra la etiqueta de histidinas.

## RESULTADOS

### Expresión y purificación.

Para conocer si las proteínas identificadas como posibles componentes de un sistema de fosforrelevo de *Kluyveromyces lactis* son funcionales, se diseñaron ensayos de fosfotransferencia *in vitro*. Estos ensayos, requieren que las proteínas que se desean analizar sean puras y en una concentración abundante. Por este motivo, se amplificaron, clonaron en plásmidos de expresión, y purificaron las proteínas identificadas como posibles componentes del sistema de de fosforrelevo de *K. lactis* utilizando como sistema de expresión a *Escherichia coli*.

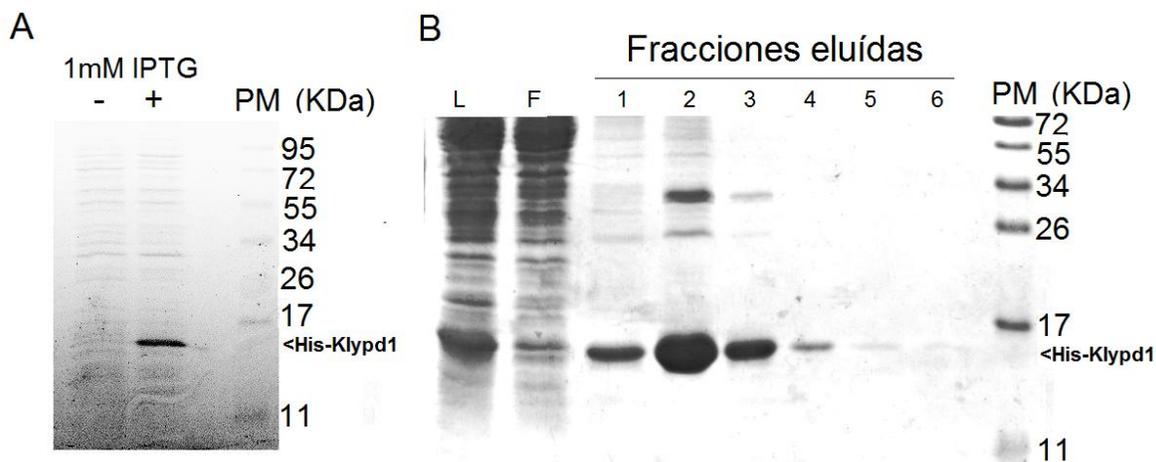
#### His-KIYpd1p

Mediante un análisis de la secuencia del gen identificado como posible homólogo de ScYpd1p en *K. lactis* (44.7% de identidad, 59.4% de similitud) con la herramienta ScanProsite del sitio web PROSITE, se observó la presencia de un dominio de fosfotransferencia que contiene histidina (Hpt) en esta proteína (KIYpd1p). Para probar si KIYpd1p es capaz de aceptar fosfatos de una histidín cinasa y transferirlos a un regulador de respuesta, se amplificó, se clonó en un plásmido de expresión y se purificó esta posible Hpt de *K. lactis*. Posteriormente la proteína purificada se utilizó para realizar ensayos de fosfotransferencia *in-vitro*.

Se amplificó el marco completo de lectura de *KIYPD1* y se clonó en el plásmido para expresión en *E. coli* pQE30. Este plásmido permite agregar una etiqueta de seis histidinas a la proteína, lo cual facilita su purificación por cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel; además, es posible regular la expresión de la proteína recombinante utilizando IPTG, pues este plásmido contiene dos secuencias del operador *lac*. Esta

regulación sólo funciona cuando se utiliza una cepa de *E.coli* que exprese constitutivamente la proteína represora de *lac*; por este motivo en estos ensayos se utilizó la cepa de *E. coli* M15 [pREP4], la cual contiene el plásmido pREP4 que contiene el gen *lacI* y confiere resistencia a kanamicina.

Se montaron las condiciones de expresión de KLYpd1p en pQE30 (His-KLYpd1p, dado que contiene la etiqueta de seis histidinas que se mencionó anteriormente) en cultivos de 5 ml. Se comprobó que dicha proteína se expresa al inducir la expresión en *E. coli* M15 con 1 mM de IPTG, durante 4 hrs a 37<sup>0</sup> en agitación constante; se analizaron mediante SDS-PAGE (fig.4A) alícuotas de lisados totales clarificados de células antes (-) y después de esta inducción (+), y se observó la aparición de una banda de 15.4 KDa en las células inducidas, que corresponde con el peso de His-KLYpd1p. Para purificar a His-KLYpd1p se indujo un cultivo de 5 ml como se describió anteriormente; se lisaron las células mediante sonicación y se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad. Se pasaron los lisados totales clarificados de estas células por una columna de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA), se lavó dicha columna y se eluyeron las proteína unidas con 100mM de imidazol en fracciones. Se analizaron por SDS-PAGE alícuotas del lisado celular total antes de pasarlo por la columna de níquel, del flujo obtenido de la columna después de pasar el lisado total, y de las fracciones eluídas con 100 mM de imidazol, en donde se observa se obtuvo la proteína pura. Se comprobó el enriquecimiento de His-KLYpd1p (15.4K Da) sobre todo en las primeras fracciones eluídas (fig.4B, carriles 3 a 6).



**Figura 4. Expresión y purificación de His-KIYpd1p.** **A)** Prueba de inducción de la expresión de His-KIYpd1p. Análisis por SDS-PAGE 15% de alícuotas de lisados totales clarificados de *E.coli* M15 transformada con pQE30-KIYPD1 antes (-), y después de una inducción por 4 hrs con 1 mM de IPTG a 37° C en agitación constante. **B)** Purificación de KIYpd1p. Análisis por SDS-PAGE 15% de alícuotas de las diferentes etapas de purificación de His-KIYpd1p mediante cromatografía con resina Ni-NTA. Carril 1: lisado clarificado, carril 2: proteínas no unidas a la columna de níquel, carriles 3 a 6: fracciones eluidas con 100 mM de imidazol. Se muestra del lado derecho estándar de peso molecular en Kilodaltones.

#### Mal-KISsk1rr

Se analizó la secuencia de la proteína identificada como posible proteína reguladora de respuesta de *K. lactis* (KISsk1p) con la herramienta ScanProsite del sitio PROSITE. Este análisis predijo que el fragmento de los aminoácidos 395 a 568, constituye un dominio regulador de respuesta que contiene un sitio aceptor de fosfatos en el aspartato 444.

Para probar si este fragmento de KISsk1p, que presenta un 56.9% de identidad y un 68.4% de similitud con la secuencia del dominio regulador de respuesta de ScSsk1, es capaz de aceptar fosfatos de la proteína aceptora-donadora de fosfatos KIYpd1p, primero se amplificó y se clonó en un plásmido de expresión y luego se purificó el fragmento correspondiente a los aminoácidos 380 al 635 de *KISSK1*. Este proceso se realizó para

obtener esta proteína lo más pura posible y en una concentración abundante para poderla analizar mediante ensayos de fosfotransferencia *in-vitro*.

Como se mencionó anteriormente, el perfil de dominios realizado con ScanProsite muestra un único sitio aceptor de fosfatos en esta proteína en el aspartato 444; para probar si esta predicción es correcta, se construyó una forma mutante del dominio regulador de respuesta de Klssk1 en la cual se sustituyó el posible aspartato aceptor 444 por una alanina. Si este sitio es efectivamente el aceptor de fosfatos, esta forma mutante de la proteína debe ser incapaz de aceptar un fosfato de Klypd1p, debido a que es imposible que se transfiera un fosfato de una proteína Hpt a un residuo de alanina.

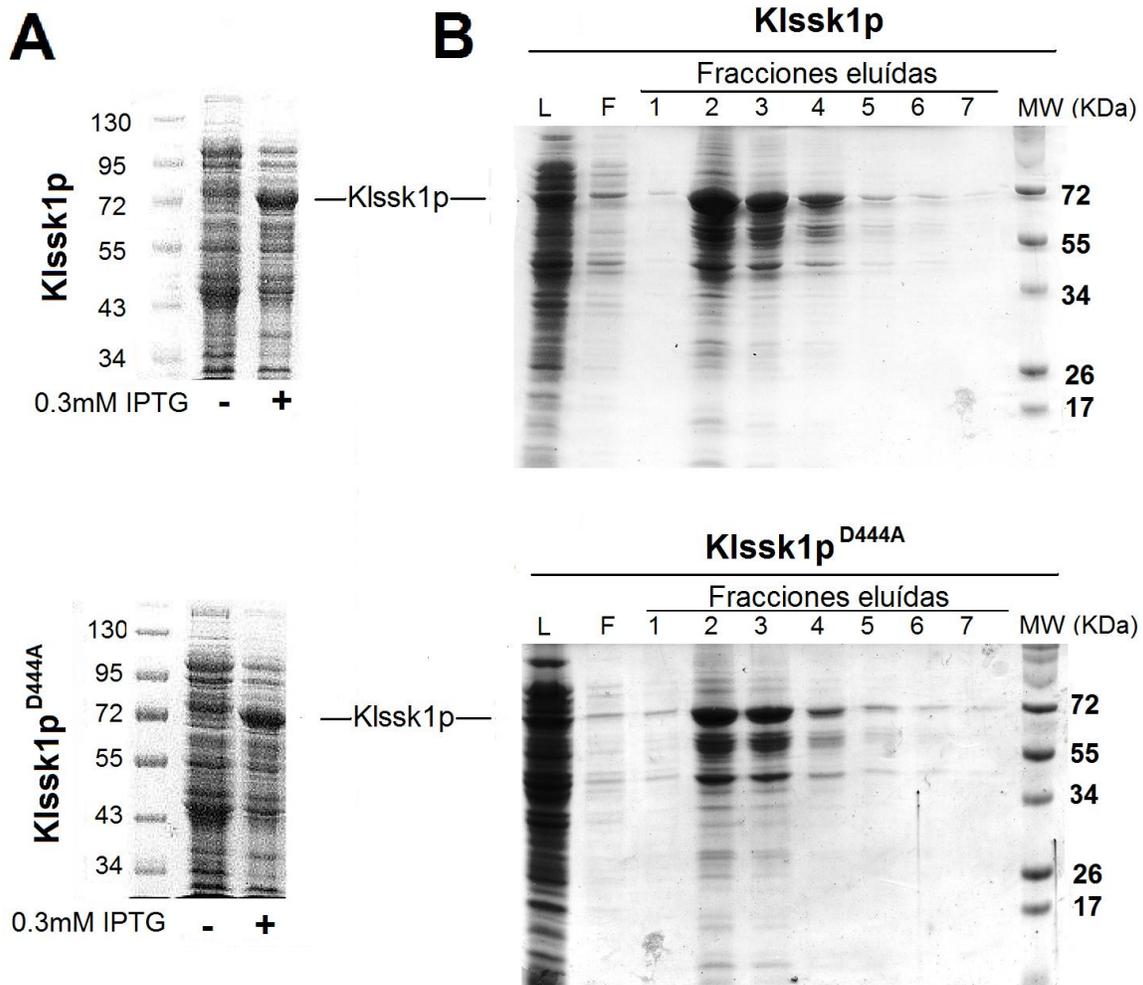
Se amplificó el fragmento final (aminoácidos 380-635) de la forma silvestre (KlSsk1p) y la variante con un cambio de aspartato por alanina en el sitio predicho como aceptor de fosfato (Klssk1p<sup>D444A</sup>) y se clonaron en el plásmido para expresión en *E. coli* p-MAL.

Se utilizó el plásmido pMAL, pues éste permite agregar como epítipo la proteína de unión a maltosa, la cual confiere una alta solubilidad a la proteína expresada en este plásmido, y permite su purificación por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa. Se utilizó la cepa de *E. coli* BL21, la cual contiene el gen de la T7 RNA polimerasa y del represor *lacI*, permitiendo que se induzca la expresión de la proteína deseada solo al incubar con IPTG.

Se probaron las condiciones para inducir la expresión de Mal-KlSsk1rr y Mal-Klssk1rr<sup>D444A</sup> lográndose una buena inducción de la expresión de ambas formas de dicha proteína al incubar a 15° C por 12 hrs con 0.3 mM de IPTG en agitación; como puede observarse en la fig. 5A, al usar dichas condiciones, se enriquece en el extracto de proteína total de células inducidas, una banda que coincide con el peso de Mal-KlSsk1rr (71.2KDa).

Se purificaron por cromatografía de afinidad con una resina de amilosa ambas formas de KlSsk1rr, y se corrieron alícuotas del lisado celular total antes de pasarlo por la columna, del eluato obtenido de la columna después de pasar el lisado total, y de las fracciones eluidas. En la fig. 5B pueden observarse los diferentes pasos de purificación de dichas

protéínas. A partir del carril 3 (elución #2) puede observarse el enriquecimiento principalmente de Mal-KlSsk1rr, cuyo peso es de 71.2 KDa; se observan algunos contaminantes también; sin embargo, dado que no interfirieron en los ensayos realizados posteriormente, no se procedió a un mayor grado de purificación.



**Figura 5. Expresión y purificación de Mal-KlSsk1rr.** **A)** Prueba de expresión de KlSsk1rr. Análisis por SDS-PAGE al 10% de alícuotas de lisados totales de *E. coli* BL21 transformada con ambas formas de pMAL-KlSsk1rr. Inducción por 12 hrs a 15° C en agitación con 0.3 mM de IPTG. **B)** Purificación de KlSsk1rr. SDS-PAGE al 15% de alícuotas de los diferentes pasos de la purificación de ambas formas de Mal-KlSsk1rr por cromatografía de afinidad con resina de amilosa. Carril 1: lisado clarificado, carril 2: proteínas no unidas a la columna de níquel, carriles 3 a 9: fracciones eluidas con 10 mM de maltosa. Se muestra del lado derecho estándar de peso molecular en Kilodaltones.

## **Establecimiento del Sistema *in-vitro* de Fosfotransferencia**

Como se mencionó anteriormente, al construir las mutantes nulas de KISLN1 y KIYPD1 no se obtuvo un fenotipo letal en *K. lactis*. Esta observación puede sugerir que, aunque se identificaron a KISln1p, KIYpd1p y KISsk1p como componentes de un sistema de fosforrelevo, es posible que estas proteínas no cumplan esta función, o no todas formen parte de este sistema. Como un primer acercamiento para conocer si el sistema de fosforrelevo era funcional, se analizó la capacidad de la proteína KIYpd1p para aceptar fosfatos de una histidín cinasa híbrida. Se analizó también, la capacidad del regulador de respuesta KISsk1p para aceptar fosfatos de esta Hpt. Para esto, se montó un sistema de fosfotransferencia heterólogo *in-vitro*, en el cual se utilizó como donador de fosfatos el fragmento de histidín cinasa y el dominio aceptor de fosfatos de la histidín cinasa híbrida de *E. coli* ArcBp.

ArcBp es una histidín cinasa sensora híbrida que forma parte de un sistema de dos componentes. En *E. coli*, este sistema regula un grupo de operones que participan en el metabolismo aerobio. ArcBp es una proteína sensora de 778 aminoácidos, que se localiza en la membrana, y contiene, además del dominio de histidín cinasa y el residuo de histidina fosforilable, un dominio similar al dominio regulador de respuesta que contiene un aspartato aceptor (Luchi et al. 1990). El estado de fosforilación de ArcBp en respuesta a la cantidad de oxígeno del ambiente depende, tanto de su actividad de cinasa, como de la actividad de fosfatasa que ejerce sobre su propio dominio aceptor; controlando así, la fosforilación y activación del regulador de respuesta de este sistema: ArcAp (Luchi, 1993).

ArcBp ha sido utilizada previamente en un sistema de fosfotransferencia heterólogo como donadora de fosfatos, en el cual se probó la fosfotransferencia entre la proteína Hpt de *Aspergillus nidulans* YpdAp y su regulador de respuesta SskAp (Azuma et al., 2007). Dado este antecedente, se decidió utilizar la histidín cinasa ArcBp para fosforilar la Hpt de *K. lactis* KIYpd1p y comprobar si KISsk1p es capaz de recibir un fosfato de esta Hpt. Dado que los dominios que componen los sistemas de fosforrelevo están bastante conservados entre especies, es posible utilizar componentes de sistemas de fosforrelevo de diferentes

organismos para montar sistemas heterólogos de fosfotransferencia. En este caso, el dominio de histidín cinasa de KISln1p comparte un 20% de identidad y un 43% de similitud con el de ArcB, siendo completamente idéntica la zona que rodea la histidina aceptora; mientras el dominio regulador de respuesta de estas histidín cinasas híbridas, comparte un 51% de similitud y un 33% de identidad.

Para fosforilar a KLYpd1p, se utilizó a la histidín cinasa híbrida ArcBp fragmentada en dominios. Un fragmento contiene el dominio de cinasa e histidina aceptora H1 (ArcB H1), y otro fragmento contiene el dominio aceptor de fosfatos (ArcB D1) \*\*. El uso de estos fragmentos fue descrito por Alvarez A.F. y Georgellis D., 2010, para el estudio *in vitro* del sistema de fosforrelevo de ArcB. El uso fraccionado de esta proteína no afectó ni su actividad de cinasa, ni la capacidad de su dominio regulador de respuesta para aceptar fosfatos. Además, dio ventajas al ensayo, pues al no tener la proteína completa, se evitó la actividad de fosfatasa que ejerce ArcBp sobre el dominio aceptor de fosfatos, manteniéndose estable la fosforilación de ArcBp por más tiempo.

Como primer ensayo, se probó que ArcBp fraccionada tuviera actividad de cinasa y que su dominio aceptor fuese capaz de fosforilarse. Se incubó a ArcB H1 en presencia de ATP [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>], y como puede observarse en la fig. 6 A, que muestra el autorradiograma del análisis por SDS-PAGE de varias reacciones de fosforilación, este fragmento de ArcBp tiene actividad de cinasa, pues como se observa en el carril 1 de la fig.6 A, aparece una banda radiactiva que coincide con ArcB H1. Se observa también (fig. 6 A, carril 2), al agregar a esta reacción el dominio aceptor de fosfatos D1, que aparece una nueva banda correspondiente a ArcB D1. Con esto se concluye que el dominio de cinasa de ArcB mantiene su actividad y es capaz de autofosforilarse, y que el fragmento que contiene el dominio aceptor de fosfatos también resulta funcional.

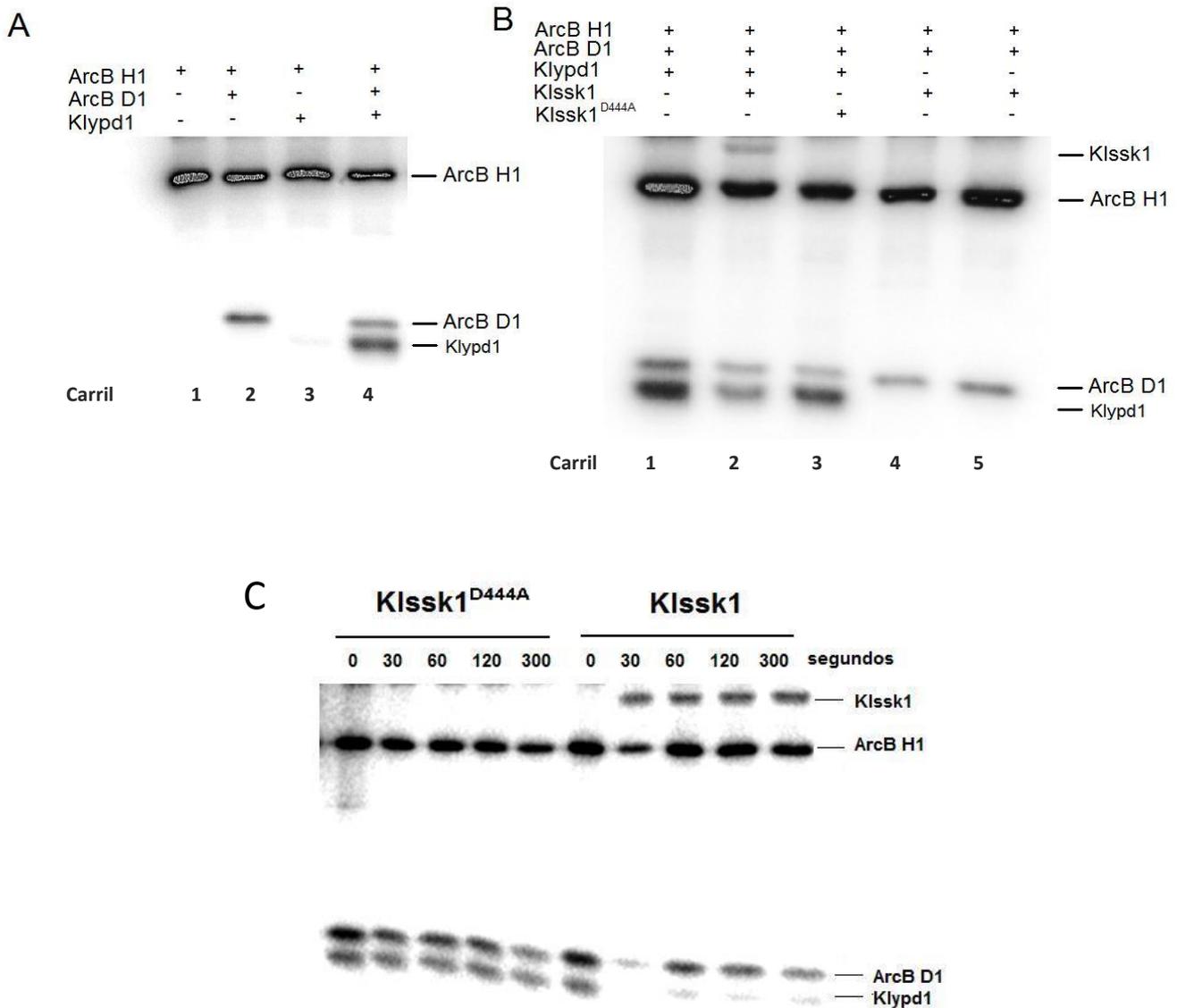
Posteriormente se probó si ArcBp es capaz de donarle fosfatos a KLYpd1p. Para esto, se incubó una reacción conteniendo a ArcB H1 o a ArcB H1+D1 en presencia de ATP [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>], y se agregó en ambas reacciones a KLYpd1p purificado. Se observó que KLYpd1p es capaz de aceptar fosfatos de ArcBp cuando es incubado en la reacción que contiene tanto el

dominio de cinasa, como el aceptor de fosfatos de ArcB (H1+D1). Como se observa en la reacción de la figura 6 A, carril 4, cuando se incuban a ArcB H1+D1 y a KIYpd1p, aparece una banda radiactiva que corresponde a KIYpd1p. En la figura 6 se puede observar también que en las condiciones usadas, la histidina aceptor de fosfatos en KIYpd1p puede ser sustrato de la histidín cinasa de ArcBp, pues, como se puede observar en la fig.6 A, carril 3, al incubarse a KIYpd1p con ArcB H1 en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, aparece una banda radiactiva tenue que corresponde a KIYpd1p. Sin embargo, al comparar el nivel de fosforilación de KIYpd1p en ambas reacciones (H1+KIYpd1p, ó H1+D1+KIYpd1p), resulta claro que es sólo cuando está presente el dominio D1 de ArcBp que se da una fosfotransferencia significativa a KIYpd1p. Con estos ensayos se comprobó que KIYpd1p es una fosfotransferasa que contiene histidina (Hpt) funcional, pues además de ser capaz de ser fosforilada en una histidina (fig.6 A, carril 3), requiere para su completa fosforilación que el fosfato que acepta sea transferido desde un aspartato contenido en un dominio aceptor de fosfatos de una histidín cinasa (fig.6 A, carril 4).

Siendo el objetivo de estos experimentos probar la capacidad de KISsk1p como aceptor de fosfatos, y de KIYpd1p como histidín fosfotransferasa (Hpt), ya que se comprobó que KIYpd1p podía ser fosforilada por ArcB H1+D1; se probó si el posible regulador de respuesta de *K. lactis*, KISsk1p, es capaz de aceptar fosfatos de esta proteína.

Para probar la fosfotransferencia a KISsk1p, primero se fosforiló a KIYpd1p incubándolo en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP con los fragmentos de ArcB H1 y D1. Posteriormente, en dos reacciones independientes, se agregó y se incubó la forma silvestre de KISsk1p, y la forma que contiene la mutación puntual en la que se cambió el aspartato 444 por una alanina (KISsk1p<sup>D444A</sup>) (fig.6B). Se esperaba que si KISsk1p participa como proteína reguladora de respuesta en el *K. lactis*, sólo podrá aceptar fosfatos de KIYpd1p y lo hará en el residuo conservado de aspartato 444. Se utilizó la variante de KISsk1p en la que se sustituyó este aspartato por una alanina para comprobar que este es el sitio aceptor de fosfatos. Si el aspartato 444 es el sitio aceptor, esta forma mutante debería ser incapaz de aceptar

fosfatos de la fosfotransferasa Klypd1p, dado que sería imposible catalizar la transferencia del fosfato de la histidina a la alanina.



**Figura 6. Ensayos de fosfotransferencia *in vitro* entre ArcBp, Klypd1p y Klssk1p** **A)** Fosforilación de Klypd1p por ArcBp. Autorradiograma del SDS-PAGE al 15% de alícuotas de las siguientes reacciones de fosforilación: carril 1 ArcB dominio H1; carril 2 ArcB dominios H1 y D; carril 3 ArcB dominio H1 + Klypd1p; carril 4 Klypd1p + dominios H1 y D1 de ArcB. **B)** Transferencia de fosfatos a Klssk1p de Klypd1p fosforilado por ArcB H1+D1. Autorradiograma del SDS-PAGE al 15% de alícuotas de las siguientes reacciones de fosforilación: carril 1 Klypd1 + ArcB H1 y D1; carril 2 Klssk1p + Klypd1p + ArcB H1 y D1; carril 3 Klssk1p<sup>D444A</sup> + Klypd1p + ArcBp H1 y D1; carril 4 Klssk1p + ArcBp H1 y D1; carril 5 Klssk1<sup>D44A</sup> + ArcB H1 y D1. **C)** Seguimiento a lo largo del tiempo de la fosfotransferencia a Klssk1p vía Klypd1p. Autorradiograma del SDS-PAGE 15% de alícuotas de las reacciones: a) ArcBp H1+D1, Klypd1p y Klssk1p silvestre y b) ArcBp H1+D1, Klypd1p y Klssk1p<sup>D444A</sup> tomadas a los tiempos referidos en la parte superior de la figura.

Al analizar la reacción en que se incubó la forma silvestre de KISsk1p, junto con ArcB H1+D1 y KIYpd1 (fig. 6B, carril 2), y compararla con la reacción en la cual KISsk1 está ausente (fig.6B, carril 1), se aprecia la aparición de una nueva banda que corresponde con KISsk1p. La presencia de esta banda depende de que se encuentre KIYpd1p en la reacción, pues como puede observarse en la fig. 6B carril 4, cuando se incubaba la forma silvestre de KISsk1p solo con ArcB H1+D1 no hay fosforilación de KISsk1p. Esto sugiere que esta proteína sí funciona como un regulador de respuesta, y que es parte de un sistema de fosforrelevo de tres componentes (histidín cinasa, histidín fosfotransferasa y regulador de respuesta) pues no puede recibir fosfatos directamente de la histidín cinasa, como sería el caso de los reguladores de respuesta que forman parte de sistemas de sólo dos componentes.

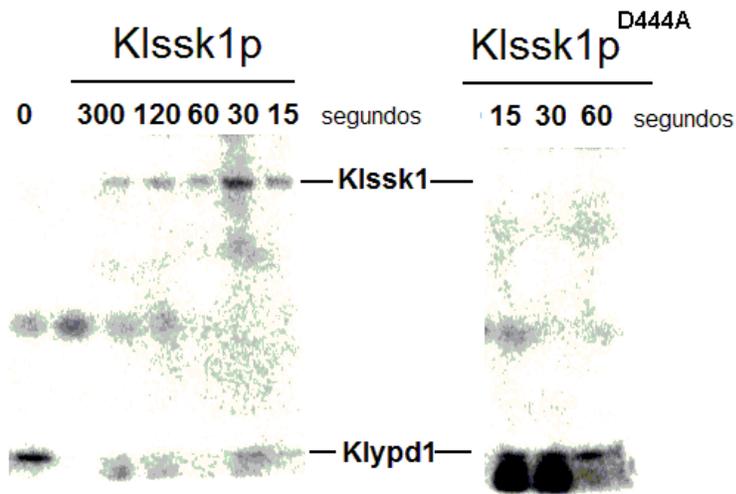
Como se esperaba, al analizar la forma mutante KISsk1p<sup>D444A</sup> se observó que esta no fue capaz de aceptar fosfatos de KIYpd1p. Esto es claro en la fig. 6B, carril 3; en donde, aún cuando se agregó a KISsk1p<sup>D444A</sup> a la reacción, el patrón de fosforilación que se presenta es el mismo que se observa cuando sólo están presentes KIYpd1p y ArcB H1+D1 (fig.6B carril1).

Para descartar que pudiese haber fosforilación de KISsk1p<sup>D444A</sup> a un tiempo ya sea menor, o mayor al que se tomó para realizar los ensayos descritos anteriormente (60 s.), se realizó un ensayo en el que se incubó a KISsk1p silvestre y a KISsk1p<sup>D444A</sup> junto con KIYpd1p y los dominios de ArcB H1 y D1 en presencia de [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] ATP. Se tomaron alícuotas de estas reacciones a diferentes tiempos hasta un máximo de 5 minutos (fig.6C); como puede observarse en los carriles 2 a 5 de la figura 6C, la forma del regulador de respuesta KISsk1p<sup>D444A</sup> no adquiere fosfatos a ningún tiempo entre los 30 y 300 segundos de incubación, mientras que la forma silvestre claramente desde los 30 segundos ya está fosforilada, y en estas condiciones se mantiene fosforilada aún 5 minutos después. Todas estas observaciones indican que efectivamente el aspartato 444 es indispensable para que se catalice la transferencia del fosfato de KIYpd1p al regulador de respuesta.

Para comprobar que la fosforilación de KISsk1p observada en el ensayo de la figura 6B y 6C, no se debe a una transferencia directa desde el dominio H1 de la histidín cinasa ArcB al regulador de respuesta KISsk1p, se diseñó un ensayo libre de la histidín cinasa, en el cual se incubó a KISsk1p con KIYpd1p previamente fosforilado (P-KIYpd1) por ArcB. Se fosforiló a KIYpd1p incubándolo junto con ArcB H1+D1 en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP por 5 minutos, después de los cuales se eliminó mediante filtración a ArcBp, quedando así solo KIYpd1p fosforilado (P-KIYpd1). Posteriormente en reacciones independientes se incubó a KISsk1p forma silvestre, y la forma con el cambio puntual de el aspartato 444 con P-KIYpd1, y se mantuvo una alícuota a la cual no se agregó ninguna de las formas del regulador de respuesta. Se tomaron alícuotas de estas reacciones a diferentes tiempos, hasta un tiempo máximo 300 segundos (fig.7).

Como se puede observar en la primera parte de la figura 7, cuando se incubó a KISsk1p con P-KIYpd1p apareció, desde los 15 segundos, una banda radiactiva que corresponde con KISsk1p; este dato corrobora que efectivamente KISsk1p es capaz de aceptar fosfatos de KIYpd1p aún en ausencia de la histidín cinasa ArcBp. Este dato muestra que KISsk1p funciona efectivamente como un regulador de respuesta, y que forma parte de un mismo sistema de fosforrelevo junto con KIYpd1p.

Además de la reacción mencionada anteriormente, se realizó de forma paralela otra en la que se utilizó a KISsk1<sup>D444A</sup>, forma del regulador de respuesta que previamente se había observado es incapaz de aceptar fosfatos de KIYpd1p. Con esta reacción se corroboró que esta forma es incapaz de catalizar la transferencia de fosfatos desde KIYpd1p. Como se puede observar en la segunda parte de la figura 7, en la que se observa el análisis de la reacción en que, aún 300 segundos después de que se incubó a KISsk1p<sup>D444A</sup> con P-KIYpd1p no apareció la banda que corresponde a KISsk1p fosforilado, y sólo se puede observar que se mantiene la banda radiactiva correspondiente a la forma fosforilada de KIYpd1p, mostrando un patrón nuevamente idéntico al que se puede observar cuando no fue agregado.



**Figura 7. Klypd1p es capaz de transferir fosfatos a Klsk1p y no a Klsk1<sup>D444A</sup>** Autorradiograma del SDS-PAGE al 15% en el que se analizó la fosfotransferencia desde P-Klypd1p a Klsk1p silvestre y a la forma mutante Klsk1p<sup>D444A</sup>. Se tomaron alícuotas a los tiempos mencionados en la parte superior de la figura (0, 15, 30, 60, 120 y 300 segundos) de las reacciones en las que se incubó a Klsk1 o a Klsk1p<sup>D444A</sup> con Klypd1p previamente fosforilado. Para fosforilar a Klypd1, se incubó con ArcBp en presencia de ATP [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] y se filtró la reacción para separar a Klypd1p de la histidín cinasa.

### Fosforilación *in-vivo* de Klypd1p en condiciones de iso e hiper-osmolaridad

Para conocer cómo sucede *in-vivo* la fosfotransferencia en la levadura *K. lactis* al someterla a un aumento en la osmolaridad, se diseñó un ensayo en el cual mediante el uso de fosfato radiactivo, se observó el estado de fosforilación de la histidín fosoftransferasa Klypd1p en condiciones de iso e hiper-osmolaridad. Para llevar a cabo este ensayo, se expresó a la proteína Klypd1p en dos cepas de *K.lactis*: una sin el sensor KlsIn1p, y otra sin la proteína hpt Klypd1p. Para observar el estado de fosforilación de las proteínas, se facilitó la incorporación de ortofosfato radiactivo en células crecidas en medio bajo en fosfatos. Ya que el ortofosfato puede ser utilizado por el metabolismo celular, podría incorporarse a las proteínas de la célula entre ellas Klypd1p.

Para expresar la proteína Klypd1p, se subclonó en el plásmido de expresión en levadura YepKDgal proveniente del plásmido pQE30 utilizado anteriormente para la purificación de dicha proteína. Se subclonó conteniendo también el epítipo de seis histidinas proveniente del plásmido pQE30. Esta nueva construcción se introdujo en las cepas mutantes nulas  $\Delta Klypd1$  y  $\Delta Klsln1$  de *K. lactis* y se comprobó la inducción de la expresión de la proteína Klypd1p creciendo cultivos de células transformantes de ambas cepas ( $\Delta Klypd1+KIYPD1$  y  $\Delta Klsln1+KIYPD1$ ) en medio rico adicionado con 2% de galactosa (YPgal). Se obtuvo expresión desde las dos horas de incubación en este medio con galactosa.

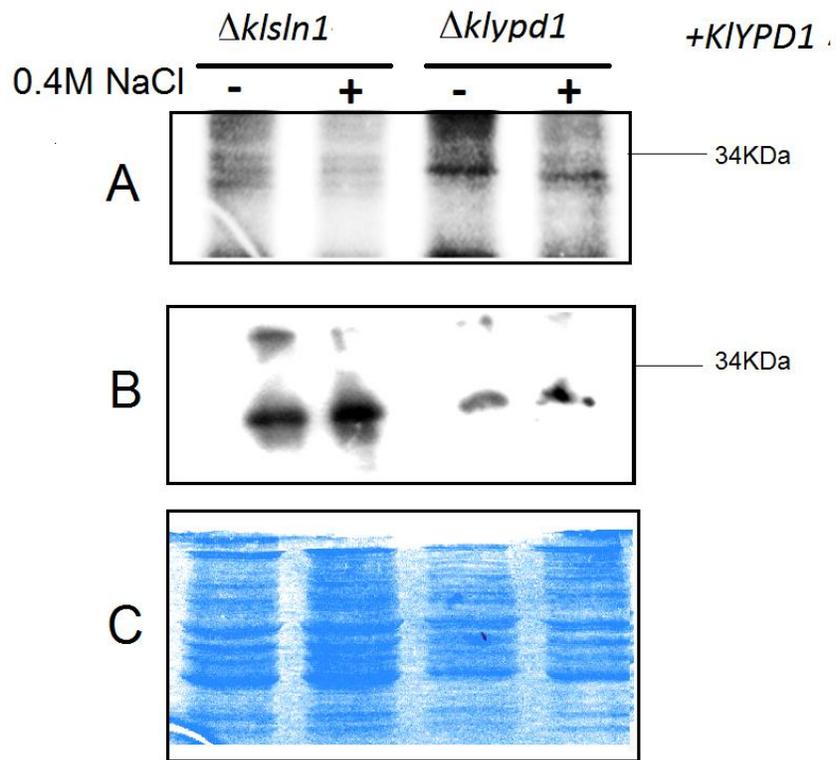
Para inducir la expresión de Klypd1p y disminuir la concentración de fosfatos intracelulares en las cepas transformadas:  $\Delta Klypd1+KIYPD1$  y  $\Delta Klsln1+KIYPD$ , se inocularon en medio YPgal bajo en de fosfatos (YPgal-Pi) y se crecieron durante 8 hrs a 30°C. Posteriormente, a estas células se les añadió 0.75 mCi de ortofosfato [<sup>32</sup>P].

Después de permanecer 15 minutos en presencia del fosfato radiactivo, los cultivos de ambas cepas se sometieron a un shock de estrés osmótico agregando NaCl [400 mM]f. Las células se lisaron en presencia de inhibidor de proteasas y se analizaron los extractos totales de proteína de ambas cepas por SDS-PAGE y posteriormente por Western blot. Se utilizó como control para ambas cepas un cultivo que fue tratado de la misma manera pero en el que no se adicionó cloruro de sodio (figura 8).

Al analizar las muestras, se esperaba observar una banda radiactiva correspondiente a Klypd1p que tuviera un peso molecular de 15 KDa; sin embargo, como puede observarse en el panel A de la figura 8, en estos ensayos, se observa la presencia de una banda marcada radiactivamente de un peso molecular que corresponde al doble del peso de Klypd1p (cerca a la banda correspondiente a los 34 KDa del marcador de peso molecular). Esta observación indica que, posiblemente, la proteína Klypd1p se encuentra *in-vivo* como un dímero. Anteriormente no se ha reportado si ScYpd1p se encuentra como dímero o monómero; sin embargo, se ha observado que tanto ScSln1p, como ScSsk1p se encuentran como dímeros y se requiere su dimerización para que sean activos. Esta banda

sí corresponde con Klypd1p, pues es reconocida por el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (figura 8, panel B) y puede observarse solamente en la cepa que contiene el sistema de fosforrelevo completo ( $\Delta Klypd1+KIYPD1$ ), y no en la mutante nula de  $\Delta Sln1$ .

Al analizar las muestras de la cepa  $\Delta Klypd1+KIYPD1$ , se puede observar que la intensidad de fosforilación de Klypd1p en las células crecidas en iso-osmolaridad es mayor que la intensidad de fosforilación de la misma proteína en células sometidas a un shock osmótico con 0.4 M de NaCl. Este efecto es evidente en la autorradiografía que se muestra en el pánel A de la figura 8 (comparar los carriles 3 y 4). Este efecto no se debe a diferencias en la concentración de proteína, pues sabemos que la concentración de proteínas en ambas condiciones analizadas es la misma, y se puede constatar al observar el gel teñido con azul de Coomassie, el cual se muestra en el panel C de la misma figura. Además, estos resultados corresponden con las observaciones previamente reportadas en *S. cerevisiae*, de que al someter a esta levadura a un aumento en la osmolaridad, disminuye la actividad de cinasa de Sln1p, y por lo tanto la fosfotransferencia hacia Ypd1p (Posas et al., 1996).



**Figura 8. Fosforilación *in-vivo* de KIYpd1p en iso e hiper-osmolaridad.** Análisis por SDS-PAGE al 15% de los extractos totales de proteína de las cepas de *Kluyveromices lactis*:  $\Delta kls1n1+KIYPD1$  y  $\Delta klypd1+KIYPD1$ , crecidas en medio pobre en fosfato, adicionado con cloruro de sodio (+) a una concentración final del 400 mM, o sin cloruro de sodio. A) Autorradiografía de este gel mostrando la incorporación de fosfato radiactivo en KIYpd1p en ambas condiciones. B) Western blot contra el epítotope de histidinas contenido en KIYpd1p. C). Gel teñido con azul de Coomassie.

## DISCUSIÓN

En la levadura *K. lactis* la ausencia de la proteína cinasa KISln1p y/o de la histidín fosfotransferasa KLYpd1p, componentes del sistema de fosforrelevo, no resultan en un fenotipo letal. Estos datos contrastan con lo observado en *S. cerevisiae*, en la que se observó que las mutantes nulas de la histidín cinasa Sln1p y/o de la histidín fosfotransferasa Ypd1p tienen un fenotipo de crecimiento defectuoso, a consecuencia de los efectos de la activación sostenida de la MAP cinasa Hog1p. Dado lo anterior, se hipotetizó que el sistema de fosforrelevo de *K. lactis* podría encontrarse inactivo cuando la levadura crece en medio iso-osmótico, y que, al aumentar la osmolaridad en el medio, la histidín cinasa se activaría, dado que esta levadura puede sobrevivir aún si carece de la histidín cinasa o de la histidín fosfotransferasa. Si en *K. lactis*, fuese sólo la forma fosforilada del regulador de respuesta la capaz de activar la vía de HOG, la ausencia de estos dos componentes río arriba, solamente ocasionaría una disminución en la capacidad de respuesta al aumento en la osmolaridad, y no se causaría así la activación constitutiva y letal de la MAP cinasa KIHog1p.

Para probar esta hipótesis, se midió primero la funcionalidad, tanto de la histidín fosfotransferasa Klypd1p, como del regulador de respuesta Klssk1p. Se montó un sistema de fosfotransferencia heterólogo *in-vitro* que demostró que es posible la interacción de los componentes de sistemas de fosforrelevo bacterianos y eucariontes, comprobando lo anteriormente descrito en Azuma et al. (2007) y en Janiak-Spens et al. (1999). Esta característica de los componentes de los sistemas de fosforrelevo, además de permitir el estudio de los sistemas de fosforrelevo *in-vitro*, muestra que la interacción molecular de componentes de los sistemas de fosforrelevo está conservada evolutivamente.

En este trabajo se utilizó a la cinasa ArcBp, que actúa como sensor e histidín cinasa híbrida en el sistema de fosforrelevo de *E. coli* que controla varios operones que participan en el metabolismo aeróbico (Iuchi et al., 1990). Para montar este sistema, no se utilizó la proteína completa como había sido reportado anteriormente, sino fraccionada en sus

diferentes dominios y se logró montar un sistema de fosfotransferencia efectivo. Esta forma de utilizar a la cinasa en dominios resultó ventajosa, pues al utilizar sólo los dominios de interés, se evitó la interferencia que pudiera ocasionarse entre los diferentes dominios de la cinasa y los componentes del sistema de fosforrelevo de *K. lactis*; además, pudo distinguirse más claramente la fosforilación y fosfotransferencia entre cada participante de este sistema de fosforrelevo.

Utilizando este sistema de fosfotransferencia Histidina-Aspartato heterólogo, se logró observar que KLYpd1 sí es funcional y capaz, tanto de aceptar fosfatos de un dominio regulador de respuesta de una cinasa híbrida (en este caso el de ArcBp que comparte un 33% de identidad y un 51% de similitud con el de KIsIn1), como de donar fosfatos a un dominio regulador de respuesta (el de KlSsk1). Esto demuestra que efectivamente esta proteína actúa como una proteína aceptora-donadora de fosfatos que contiene histidina (Hpt). Esto se apoya con la alta identidad que existe entre esta proteína y su homóloga en *S. cerevisiae*.

Se observó también que aún al utilizar las proteínas fragmentadas, la fosfotransferencia se dio siempre de ArcBp hacia KlSsk1p, a través de KLYpd1p, y no en el sentido inverso desde KlSsk1p hacia ArcBp. Anteriormente se ha descrito que el sitio de interacción con el dominio regulador de respuesta de la histidín fosfotransferasa de *S. cerevisiae* Ypd1p es bastante promiscuo (Xu et al., 2003), debido a que la función de esta histidín fosfotransferasa es justamente interactuar con reguladores de respuesta distintos; sin embargo, aunque es capaz de interactuar y transferir fosfatos a los tres diferentes reguladores de respuesta que controla, tanto la interacción, como la transferencia hacia el regulador de respuesta Ssk1p, son más favorecidas (West & Porter, 2005). Dado que en los ensayos que se realizaron en este trabajo, se emplearon los dominios reguladores de respuesta tanto de la proteína reguladora de respuesta como de la histidín cinasa, podría esperarse que hubiese transferencia de fosfatos de KLYpd1p al regulador de respuesta de la histidín cinasa; sin embargo, con la metodología utilizada en este trabajo, dicha reacción no pudo apreciarse, mostrando que es mucho más favorable la transferencia de fosfatos hacia la proteína reguladora de respuesta, como sucede también en *S. cerevisiae*.

En general en los sistemas de fosforrelevo, es la histidín cinasa la que, al sentir el estímulo, desencadena los eventos de fosforilación que encienden a la proteína reguladora de respuesta. Por lo que, la transferencia de fosfatos debe ser más favorable hacia el regulador de respuesta cuando la histidín cinasa está encendida. Así que, la fosfotransferencia más favorable hacia Klssk1p en el sistema *in vitro* de *K. lactis*, apoya la idea de que esta proteína es el último eslabón en el flujo de fosfatos, tal como sucede para otros reguladores de respuesta descritos (Stock et al., 2000).

Con los datos de este trabajo demostramos que las proteínas KIYpd1p y Klssk1p de *K. lactis* son componentes de un mismo sistema de fosforrelevo, y que Klssk1p puede aceptar fosfatos de una histidín cinasa, siempre y cuando esté presente la histidín fosfotransferasa KIYpd1p. Aún en ausencia de la histidín cinasa, si la Hpt se encuentra fosforilada, es capaz de transferir fosfatos a Klssk1p. El orden en que sucede la transferencia es entonces de la histidín cinasa a la histidín fosfotransferasa, y de ésta al regulador de respuesta, como se ha descrito para otros sistemas (Saito, 2001).

Mediante este sistema se comprobó también que el dominio regulador de respuesta de KlSsk1p es capaz de aceptar un fosfato en el aspartato 444. El motivo aceptor de fosfatos, en donde se encuentra el aspartato aceptor, está altamente conservado, por lo que es posible identificarlo con programas de predicción de motivos como el que se utilizó en este trabajo. Además, este dominio presenta una alta identidad con el dominio que se ha reportado como regulador de respuesta en Ssk1p de *S. cerevisiae* (Posas & Saito, 1998). Se realizó una mutación puntual cambiando el aspartato predicho como aceptor por una alanina. Al utilizar esta variante en los ensayos de fosfotransferencia *in-vitro*, el fosfato en KIYpd1p no pudo ser transferido, pudiéndose observar sólo la forma fosforilada de esta Hpt. Dado esto, se concluyó que es este aspartato el único residuo capaz de aceptar fosfatos en esta proteína.

Como aproximación para conocer cómo funciona el sistema de fosforrelevo en la célula, se diseñó un ensayo *in-vivo* en el que se observó indirectamente la respuesta de la histidín cinasa Klsln1p a un aumento en la osmolaridad, observando el estado de fosforilación de

la proteína aceptora-donadora de fosfatos Klypd1p en su estado basal y al someter a la célula a un choque osmótico. Se observó que cuando la levadura es sometida a un aumento en la osmolaridad, el estado de fosforilación de la Hpt Klypd1p disminuye en comparación a como se encuentra en estado basal. Esto indica que la histidín cinasa de *K. lactis*, Klsln1p, se encuentra encendida y fosforilando a Klypd1p en condiciones iso-osmóticas, y que al someter a la célula a un aumento en la osmolaridad del medio la actividad de cinasa de Klsln1p disminuye; por lo tanto, disminuye el flujo de fosfatos hacia la Hpt Klypd1p, y en consecuencia también hacia el regulador de respuesta. Estos datos sugieren entonces que, al contrario de cómo fue planteado en la hipótesis de este trabajo, es la forma no fosforilada del regulador de respuesta Klsk1p la capaz de desencadenar la respuesta a estrés osmótico.

En este ensayo de fosforilación *in-vivo* de Klypd1p, se pudo apreciar también, que Klypd1p se encuentra como dímero; anteriormente se ha descrito que para que el sistema de fosforrelevo funcione correctamente se requiere que, tanto la histidín cinasa como el regulador de respuesta se encuentran siempre como dímeros (Ostrander & Gorman, 1999; Horie et al., 2008); con este trabajo demostramos que también la histidín fosfotransferasa actúa como dímero incluso, y probablemente represente también un factor importante para que se pueda dar la fosfotransferencia.

Hog1p es una cinasa de la familia de las MAP cinasas activadas por estrés, que para contrarrestar los efectos del aumento en la osmolaridad. Dentro de estas acciones, se ha observado que estimula el flujo de iones de sodio al exterior mediante la fosforilación del antiportador Nha1p y del canal de potasio Tok1p (Proft & Struhl, 2004), además de que regula el flujo de glicerol al exterior mediante la fosforilación del canal exportador de glicerol Fps1p (Thorsen et al., 2006). Esta cinasa controla la expresión de casi 600 genes en respuesta al estrés osmótico (O'Rourke & Herskowitz, 2004). Dentro de esto, se encuentra Slt1p, sistema que permite aumentar el glicerol intracelular mediante la importación de glicerol de forma activa del medio (Posas et al., 2000). Además, contribuye al aumento en la producción de glicerol intracelular, induciendo la expresión de las enzimas glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (codificada por los genes *GPD1* y *GPD2*) y glicerol-3-fosfatasa

(codificada por los genes *GPP1* y *GPP2*) (Rep et al., 1999). Otra acción de Hog1p está involucrada en la regulación del ciclo celular, pues previene la progresión del ciclo celular cuando está activa, fosforilando a la proteína reguladora de la progresión de G1 a S, Sic1p (Escoté et al., 2004).

Al estar ausentes la histidín cinasa, o la Hpt Ypd1p, el regulador de respuesta Ssk1p activa de forma constitutiva la cascada de fosforilación de Hog1p, constituida por la MAPKKK Ssk2/22 y la MAPKK Pbs2p, ocasionando que Hog1p se encuentre fosforilado y activo constitutivamente (Ostrander & Gorman, 1999). Esta activación constitutiva resulta letal para la célula, pues al estar Hog1p activo de forma sostenida, le es imposible salir del arresto en G1, así como sobrevivir al aumento desmesurado de la concentración de glicerol intracelular que se ocasiona.

En nuestro laboratorio se ha caracterizado la respuesta a estrés osmótico en *K. lactis*; se identificó al homólogo Hog1p, y se ha observado que esta cinasa, en ausencia de KISln1p o de KIYpd1p, no se encuentra fosforilada. También se observó al comparar la concentración de glicerol intracelular en *K.lactis* y *S.cerevisiae*, que las mutantes nulas de KISln1p y KIYpd1p no presentan un aumento en la concentración intracelular de glicerol, a diferencia de la mutante en *S.cerevisiae*, en la cual en ausencia de Sln1p la concentración intracelular de glicerol aumenta al mismo nivel que cuando la levadura es sometida a un aumento en la osmolaridad. Esto indica que, a diferencia de *S.cerevisiae*, en *K.lactis*, la MAP cinasa KIHog1p no está activa de forma sostenida cuando los componentes del sistema de fosforrelevo KISln1p o KIYpd1p no están presentes.

Estos datos muestran que aunque la vía de respuesta al estrés osmótico de *K. lactis* parece funcionar de forma muy similar a la de *S. cerevisiae*, existen importantes diferencias en la forma en que se regula. En el caso del sistema de fosforrelevo, es probable que cuando el regulador de respuesta KISsk1p se encuentre defosforilado y activo, se requiera de la activación de algún otro componente para que se pueda transducir la señal. Dado que la interacción entre KISsk1p y MAPKKK KIsk2p es clave para que se pueda activar la cascada de respuesta a estrés osmótico por la vía del fosforrelevo, es posible que para lograr dicha interacción se requiera, ya sea de otro componente o de algún otro estímulo.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con este trabajo se demuestra, mediante diferentes ensayos, que la levadura *K. lactis* contiene un sistema de fosforrelevo funcional, en el cual las proteínas Klypd1p y KISsk1p funcionan respectivamente como histidín fosfotransferasas y reguladores de la respuesta.

*In-vivo* se determinó que la fosforilación de la proteína Hpt Klypd1 disminuye cuando esta levadura es sometida a un shock osmótico, lo cual muestra que este sistema de fosforrelevo responde a un aumento en la osmolaridad del medio disminuyendo su actividad de forma similar a como sucede en *S.cerevisiae*. Estos datos contradicen la hipótesis planteada, y dejan aún abierta la cuestión de por qué no resulta letal en esta levadura la ausencia ni de la histidín cinasa, ni de la proteína Hpt.

Dado que este trabajo mostró solo una aproximación inicial al estudio del sistema de fosforrelevo de *K. lactis*, resultaría interesante por ejemplo, caracterizar cinéticamente a la histidín cinasa KISln1p. Para esto se podría utilizar el sistema de fosfotransferencia *in-vitro* que fue montando en este trabajo, utilizando ahora esta cinasa en vez de ArcBp. Mediante estos ensayos se podrían caracterizar los parámetros cinéticos, tanto de la actividad de cinasa de KISln1p, como de la transferencia de fosfatos entre los diferentes componentes del sistema. Para definir si las diferencias observadas entre el sistema de fosforrelevo *K.lactis* y el de *S. cerevisiae* se deben a diferencias intrínsecas en el funcionamiento de los proteínas, se podrían expresar los componentes del fosforrelevo de *K.lactis* en *S. cerevisiae*. Esto nos respondería si en *K.lactis* existen elementos, que sólo en esta levadura participan regulando la actividad de los componentes del sistema de fosforrelevo, o si la proteína “per se” difiere en la forma en que funciona.

Resultaría interesante también comprender cómo se regulan e interactúan componentes río abajo en la vía de señalización a estrés osmótico; es probable que existan diferencias en la regulación de las proteínas que se encuentran río abajo del sistema de fosforrelevo, en la vía de respuesta a estrés osmótico, que sean reguladas de forma tal, que, aunque el

sistema de fosforrelevo se encuentre señalizando positivamente, eviten que se transduzca la señal y se active la respuesta mediada por la MAP cinasa Hog1p.

Además de esto, dado que en otros hongos los sistemas de fosforrelevo participan en otras respuestas celulares, es posible que este sistema participe en otras funciones celulares, por lo que sería importante probar las respectivas mutantes de este sistema en otros tipos de estrés.

## BIBLIOGRAFÍA

- Azuma, N. et al., 2007. In Vitro Analysis of His-Asp Phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: The First Direct Biochemical Evidence for the Existence of His-Asp Phosphotransfer Systems in Filamentous Fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), pp.2493-2502.
- Alvarez F.A., Georgellis D., 2010. *In Vitro* and *In Vivo* Analysis of the ArcB/A Redox Signaling Pathway. *Methods in Enzymology*, 471(cap.12), pp.205-228.
- Brewster, J.L. et al., 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), pp.1760-3.
- Brown, J.L. & Bussey, H., 1993. The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), pp.6346-56.
- Brown, J.L., Bussey, H. & Stewart, R.C., 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *The EMBO journal*, 13(21), pp.5186-94.
- Chang, C. et al., 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5133), pp.539-44.
- Cheung, J. & Hendrickson, W. a, 2010. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), pp.116-23.
- Escoté, X. et al., 2004. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biology*, 6(10), pp.997-1002.
- Fassler, J S et al., 1997. Activated alleles of yeast SLN1 increase Mcm1-dependent reporter gene expression and diminish signaling through the Hog1 osmosensing pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(20), pp.13365-71.
- Fassler, Jan S & West, A.H., 2010a. *Methods in Enzymology: Two-Component Signaling Systems, Part C*, Elsevier.
- Fassler, Jan S & West, A.H., 2010b. Genetic and Biochemical Analysis of the SLN1 Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 471(10), pp.291-317.
- Fukuhara, H., 2003. The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Research*, 3(4), pp.327-31.
- Horie, T. et al., 2008. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the yeast high-

- osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), pp.5172-83.
- Iuchi, S., 1993. Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), p.23972.
- Iuchi, S. et al., 1990. The arcB gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon. *Molecular Microbiology*, May 4(5), pp.715-27.
- Janiak-Spens, F., Sparling, D.P. & West, A.H., 2000. Novel Role for an HPT Domain in Stabilizing the Phosphorylated State of a Response Regulator Domain. *Journal of Bacteriology*, 182(23), pp.6673-6678.
- Janiak-Spens, F. et al., 1999. Differential Stabilities of Phosphorylated Response Regulator Domains Reflect Functional Roles of the Yeast Osmoregulatory SLN1 and SSK1 Proteins. *Journal of Bacteriology*, pp.411 -417.
- Kawasaki, L. et al., 2008. Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), pp.78-85.
- Kim, D. & Forst, S., 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology*, 147(Pt 5), pp.1197-212.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., 1998. *The yeasts, a taxonomic study*, Elsevier.
- Li, S et al., 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *The EMBO journal*, 17(23), pp.6952-62.
- Li, Sheng et al., 2002. The Eukaryotic Two-Component Histidine Kinase Sln1p Regulates OCH1 via the Transcription Factor , Skn7p. *Molecular Biology of the Cell*, 13(February), pp.412- 424.
- Maeda, T, Takekawa, M. & Saito, H, 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), pp.554-8.
- Maeda, T, Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H, 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), pp.242-5.

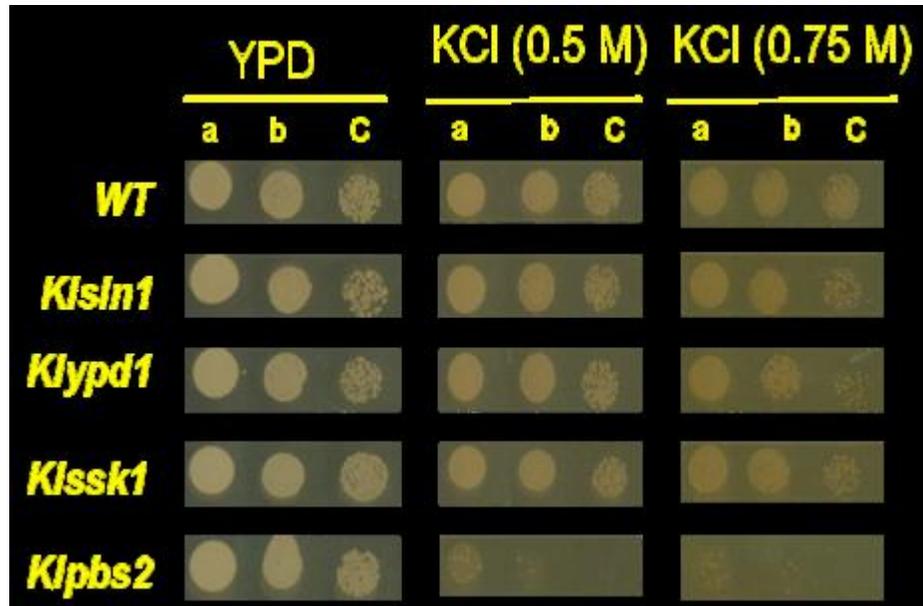
- Mei-Yeh, J., Deschenes, Robert J & Fassler, Jan S, 2003. Saccharomyces cerevisiae Histidine Phosphotransferase Ypd1p Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm for SLN1-Dependent Phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryotic Cell*, 2(6), pp.1304-1314.
- van Ooyen, A.J.J. et al., 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 6(3), pp.381-92.
- Ostrander, D.B. & Gorman, J. a, 1999. The extracellular domain of the Saccharomyces cerevisiae Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *Journal of Bacteriology*, 181(8), pp.2527-34.
- Ota, I.M. & Varshavsky, a, 1992. A gene encoding a putative tyrosine phosphatase suppresses lethality of an N-end rule-dependent mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), pp.2355-9.
- Ota, I.M. & Varshavsky, A., 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5133), pp.566-9.
- O'Rourke, S.M.O. & Herskowitz, I., 2004. Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(February), pp.532-542.
- Porter, S.W., Xu, Q. & West, A.H., 2003. Ssk1p response regulator binding surface on histidine-containing phosphotransfer protein Ypd1p. *Eukaryotic Cell*, 2(1), pp.27-33.
- Posas, F. & Saito, H, 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO journal*, 17(5), pp.1385-94.
- Posas, F. et al., 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), pp.17249-55.
- Posas, F. et al., 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, 86(6), pp.865-75.
- Proft, M. & Struhl, K., 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell*, 9(6), pp.1307-17.
- Proft, M. & Struhl, K., 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3), pp.351-61.

- Reiser, Vladimir, Raitt, D.C. & Saito, Haruo, 2003. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), pp.1035-40.
- Rep, M. et al., 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), pp.5474-85.
- Saito, H, 2001. Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chemical Reviews*, 101(8), pp.2497-509.
- Sato, N. et al., 2003. Phosphorelay-Regulated Degradation of the Yeast Ssk1p Response Regulator by the Ubiquitin-Proteasome System. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), pp.6662-6671.
- Sherman, D. et al., 2009. Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Research* 37(Database issue), pp.pp. D550-4.
- Siderius, M. et al., 2000. Candidate osmosensors from *Candida utilis* and *Kluyveromyces lactis*: structural and functional homology to the Sho1p putative osmosensor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517(1), pp.143-7.
- Stock, a M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, pp.183-215.
- Tanaka, T. et al., 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*, 396(6706), pp.88-92.
- Thorsen, M. et al., 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10), pp.4400-10.
- Warner, J., 1971. Labeling of RNA and Phosphoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 246(447), pp.423-428.
- West, A.H. & Porter, S.W., 2005. A common docking site for response regulators on the yeast phosphorelay protein YPD1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1748(2), pp.138-145.
- Wolf, K., Breunig, K. & Barth, G., 2003. *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and, biotechnology:Practical Protocols*, Springer 494pps.

- Xu, Q. & West, A.H., 1999. Conservation of structure and function among histidine-containing phosphotransfer (HPT) domains as revealed by the crystal structure of YPD1. *Journal of Molecular Biology*, 292(5), pp.1039-1050.
- Xu, Q., Porter, S.W. & West, A.H., 2003. The Yeast YPD1/SLN1 Complex: Insights into Molecular Recognition in Two-Component Signaling Systems. *Structure*, 11(12), pp.1569-1581.
- Zhao, X. et al., 2008. Crystal structure of a complex between the phosphorelay protein YPD1 and the response regulator domain of SLN1 bound to a phosphoryl analog. *Journal of Molecular Biology*, 375(4), pp.1141-51.

## APENDICE

### Figura Suplementaria



Pruebas por goteo de diluciones seriales de las mutantes nulas de las proteínas KlSln1p, KlYpd1p y Klssk1p, componentes del sistema de fosforrelevo de *Kluyveromyces lactis*. Se muestra el crecimiento en diferentes concentraciones de KCl. No se observó sensibilidad al estrés osmótico en ausencia de cualquiera de los posibles componentes del sistema de fosforrelevo de *K. lactis*; esto es evidente al observar la fuerte sensibilidad de la mutante nula de la MAP cinasa cinasa Klpbs2p (observaciones no publicadas de Rodríguez et al.)

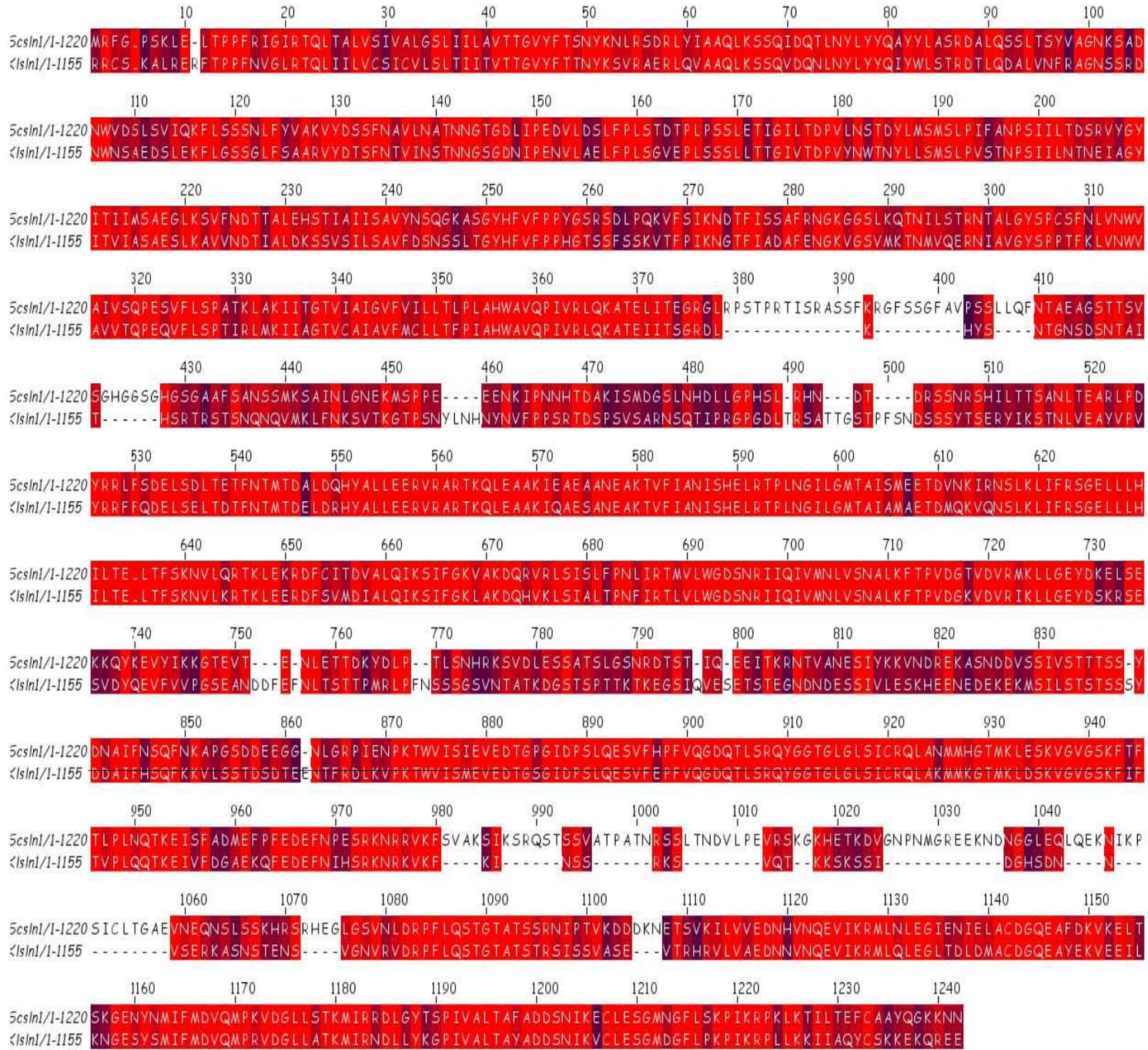
## Alineamientos de secuencias

Se muestran a continuación los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de los componentes del sistema de fosforrelievo de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Kluyveromyces lactis*. Para realizar los alineamientos, se utilizó la matriz EBLOSUM62 en el programa Stretcher provisto por EMBOSS. La presentación gráfica se obtuvo utilizando el programa Jalview provisto por la Universidad de Dundee, se coloreó en los aminoácidos según el grado de identidad utilizándose el color rojo para los aminoácidos con un mayor porcentaje y el azul para el menor.

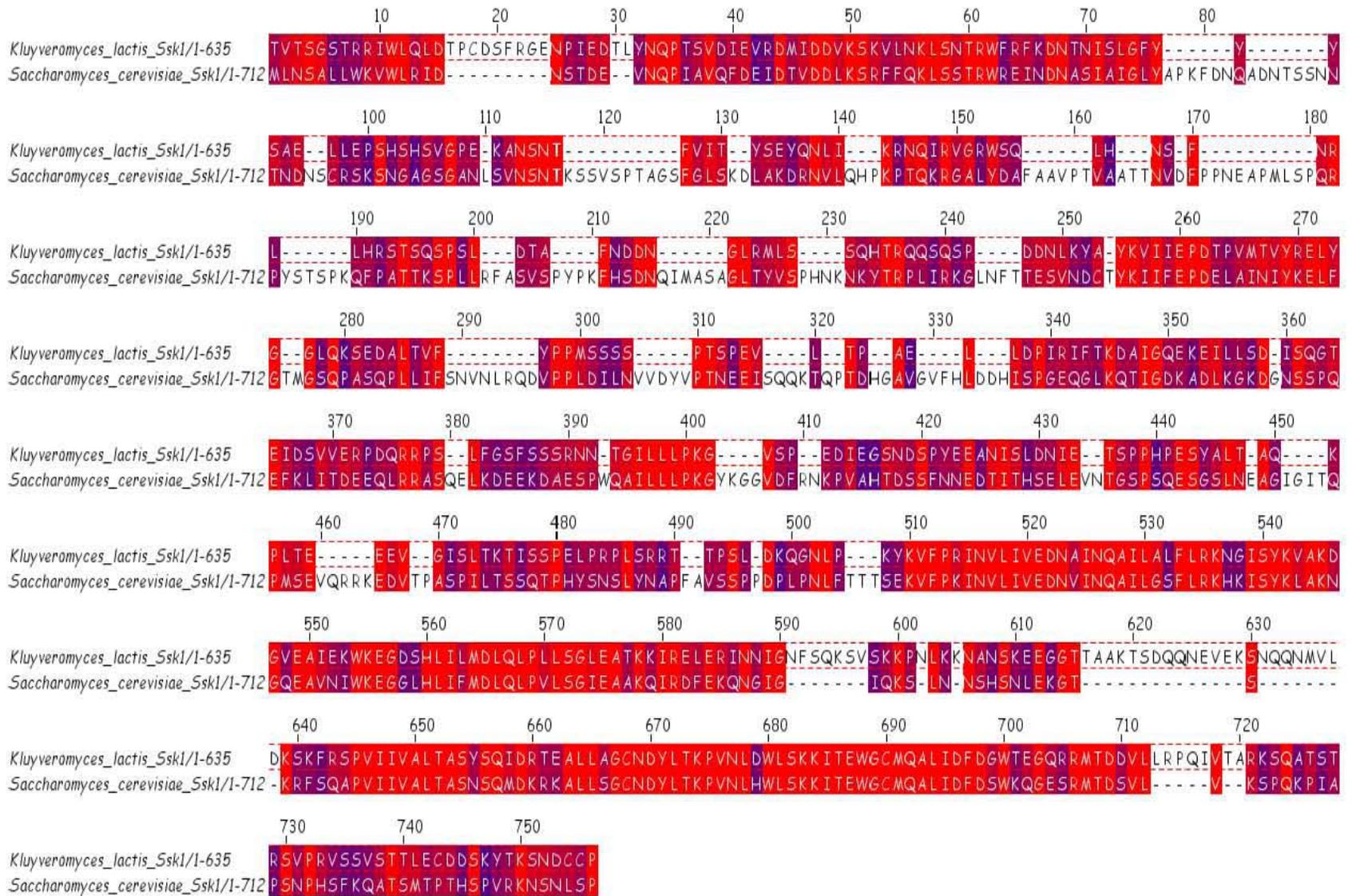
### Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín fosfotransferasa KLYpd1p contra la secuencia de aminoácidos de Ypd1p de *S. cerevisiae*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
SCYPD1/1-167	MST	IPSEIINWTILNEIISMBDDDDSDFSKGLIIQFIDQAQTTF AQMQRQLDGEKNL TELDNLGHFLKGSSAALGLQRIAWVCERIQNLGRKME	HFFPNKTEL							
KLYPD1/1-135	MSG	TPIIDKVINWDILNEIVSMDEDDAGFSQSLLIQFFEQATSTFNQIEQHIKTDKNLDQLGQLGHFLKGSSASLGLQRIAWVCERIQNYGQKRE	-----							
	110	120	130	140	150	160				
SCYPD1/1-167	VNTLSdKSIING	GINIDEDD	EEIKIQVDDKDENS	YLIILIAKALNQR	LEFKLAR	TELSKYNTNL				
KLYPD1/1-135	-----	GGGITDDN	-----	YIQLIQNSLDLAR	KEFDSA	SELGQYYKTQF				

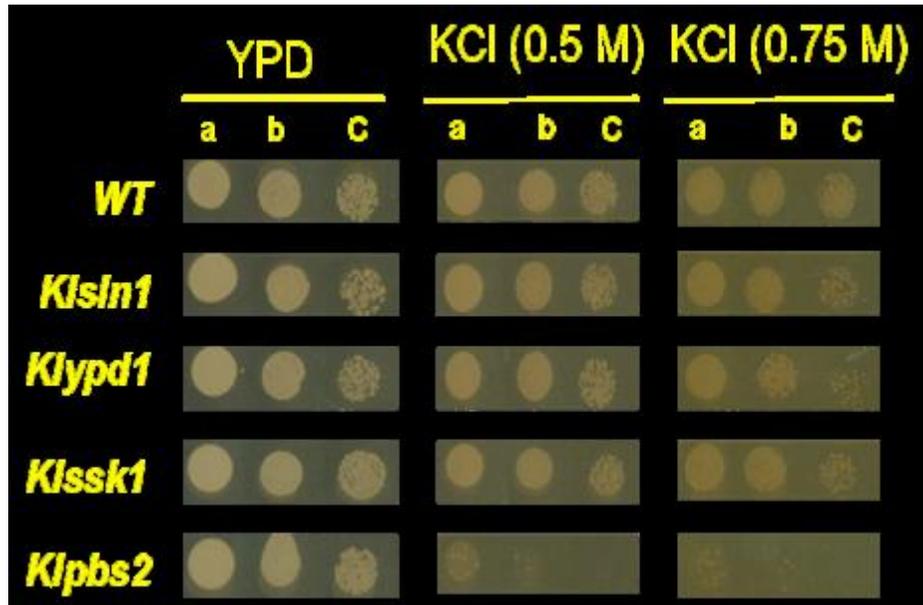
Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín cinasa KIsln1p contra la secuencia de aminoácidos de Sln1p de *S. cerevisiae*



Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína reguladora de respuesta K1Ssk1p contra la secuencia de aminoácidos de Ssk1p de *S. cerevisiae*



## Figura Suplementaria



Pruebas por goteo de diluciones seriales de las mutantes nulas de las proteínas *Klsln1p*, *Klypd1p* y *Klssk1p*, componentes del sistema de fosforrelevo de *Kluyveromyces lactis*. Se muestra el crecimiento en diferentes concentraciones de KCl. No se observó sensibilidad al estrés osmótico en ausencia de cualquiera de los posibles componentes del sistema de fosforrelevo de *K. lactis*; esto es evidente al observar la fuerte sensibilidad de la mutante nula de la MAP cinasa cinasa *KlPbs2p* (observaciones no publicadas de Rodríguez et al.)

## Alineamientos de secuencias

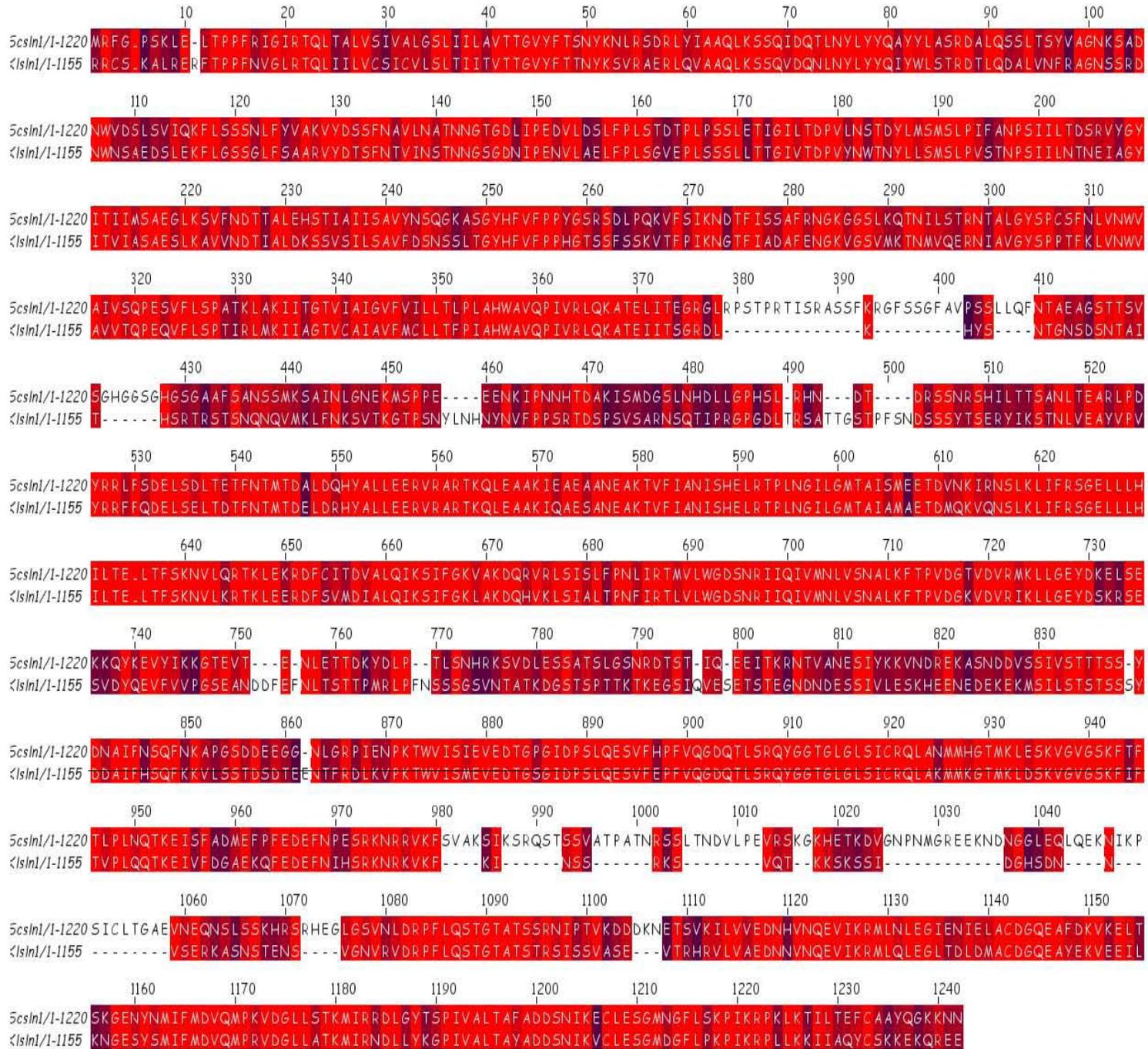
Se muestran a continuación los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de los componentes del sistema de fosforrelievo de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Kluyveromyces lactis*. Para realizar los alineamientos, se utilizó la matriz EBLOSUM62 en el programa Stretcher provisto por EMBOSS. La presentación gráfica se obtuvo utilizando el programa Jalview provisto por la Universidad de Dundee, se coloreó en los aminoácidos según el grado de identidad utilizándose el color rojo para los aminoácidos con un mayor porcentaje y el azul para el menor.

### Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín fosfotransferasa KLYpd1p contra la secuencia de aminoácidos de Ypd1p de *S. cerevisiae*

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
SCYPD1/1-167 MST - - - IPSEIINWTLNEIISMDDDDSDFSKGLIIQFIDQAQTTF AQMQRQLDGEKNLTEL DN LGHFLKGSSAALGLQRIAWVCERIQNLGRKMEHFFPNKTEL
KLYPD1/1-135 MSGTPRIPDKVINWDILNEIVSMDEDDAGFSQSLLIQFFEQATSTFNQIEQHIKTDKNLDQLGQLGHFLKGSSASLGLQRIAWVCERIQNYGQKRE-----
      110      120      130      140      150      160
SCYPD1/1-167 VNTLSDKSIINGINIDEDDEEIKIQVDDKDENSIYLLIIAKALNQRLEFKLARIELSKYYNTNL
KLYPD1/1-135 -----GSGITDDN-----YIQLIQNSLDLARKFFDSAKSELGQYYKTQF
```

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la histidín cinasa KIsIn1p contra la secuencia de aminoácidos de Sln1p de *S. cerevisiae*



**Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína reguladora de respuesta K1Ssk1p contra la secuencia de aminoácidos de Ssk1p d**

