

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

13

UNIDAD IZTAPALAPA

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“IDENTIFICACION DEL GEN TOR DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis* A PARTIR DE UN ESTUDIO DE EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES EN SUS DOS TIPOS CELULARES HAPLOIDES”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL PRESENTA:

BERNARDO CHAPA Y LAZO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

ASESORES:

**DRA. LAURA ONGAY LARIOS
DR. MARIANO GARCIA GARIBAY**

COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - IZTAPALAPA

México, D.F.

Mayo de 2001

225716

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I), se encuentra en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), según el número de registro 309-0.

Se reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado durante la realización de la maestría, a través de la beca-crédito número 128670, durante el periodo de Enero de 1999 a Enero de 2001.

El presente trabajo se hizo en el laboratorio 302-Oriente del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega.

Se agradece especialmente a María Guadalupe Códiz Huerta y Marcela Sosa Garrocho de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo técnico brindado para el desarrollo del presente trabajo.

Agradecimientos

A mi tutor y a mis asesores, por su invaluable buena disposición, por su apoyo y por lo que me han enseñado.

A mis compañeros de laboratorio, por haberme ayudado siempre y por su amistad.

A mis amigos Luis y Eliana, por compartir sus mundos con el mío.

A Rocío, por compartir su vida conmigo.

A mi papá y mi mamá, por TODO.

INDICE

Resumen

INTRODUCCION	1
---------------------	---

ANTECEDENTES

<i>Kluyveromyces lactis</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
¿Por qué <i>Kluyveromyces lactis</i> ?	8

OBJETIVO	10
-----------------	----

HIPOTESIS	10
------------------	----

JUSTIFICACION	10
----------------------	----

METODOLOGIA

Cepas y medios de cultivo	11
Extracciones de DNA de levaduras	11
Extracciones de RNA de levaduras	12
Ensayos de hibridación	
<u>Southern Blot</u>	12
<u>Northern Blot y Dot Blot</u>	13
<u>Hibridación en colonias</u>	13
Marcaje de sondas	13
Purificación de DNA de geles de agarosa	14
Ligación de moléculas de DNA	14
Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5a	14

Construcción de bibliotecas	
<u>Biblioteca genómica</u>	14
<u>Biblioteca de cDNA</u>	15
Transformación de levaduras	15
Ensayos de apareamiento	16
Despliegue diferencial	17
Secuenciación	18
Análisis de secuencias de DNA	18
RESULTADOS y DISCUSION	19
Identificación de genes de <i>K. lactis</i> por homología con genes de <i>S. cerevisiae</i>	19
Despliegue diferencial	22
CONCLUSIONES	39
APENDICE I	40
APENDICE II	43
BIBLIOGRAFIA	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Figura 2.- Control de la expresión de genes por MAT	3
Figura 3.- Vía de respuesta a feromonas en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 4.- Interconversión del tipo sexual en <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura 5.- Vía de respuesta a feromonas en <i>K. lactis</i>	8
Figura 6.- Obtención de sondas de los receptores de feromonas (STE2 y STE3)	20
Figura 7.- Southern Blot con sondas STE2 y STE3	20
Figura 8.- Plásmido pSK1	22
Figura 9.- Despliegue diferencial	23
Figura 10.- Reamplificación y clonación de fragmentos con expresión diferencial	24
Figura 11.- Northern Blot y Dot Blot con sondas 1a, 2a, 3a y 4a	26
Figura 12.- Southern Blot de DNA de <i>K. lactis</i> con sonda 2a	26
Figura 13.- Southern Blot de fragmentos <i>EcoRI-PstI</i> y <i>EcoRI-XbaI</i> con sonda 2a	27
Figura 14.- Hibridación de colonias con sonda 2a	28
Figura 15.- Esquema de hibridación de TOR de <i>K. lactis</i> con 2a	38
Figura del Apéndice I.- Sistema del Doble Híbrido	41
Figura A.- Plásmido YIp351 y fragmentos de STE4 clonados en él	44
Figura B.- Ensayo de apareamiento entre <i>S. cerevisiae</i> 70 y mutantes en G β	45

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1.- Genes específicos de tipo celular en <i>S. cerevisiae</i>	2
Tabla 2.- Características de levaduras que se usan para expresar genes heterólogos	9
Cuadro 1.- Secuencias de los fragmentos 1a, 2a, 3a y 4a del despliegue diferencial	25
Cuadro 2.- 2a tiene identidad de 70.3% con un quimiorreceptor de <i>S. typhimurium</i>	27
Cuadro 3.- Comparación de 2a con TOR1 de <i>S. cerevisiae</i> (nucleótidos)	29
Cuadro 4.- Comparación de 2a con TOR2 de <i>S. cerevisiae</i> (nucleótidos)	32
Cuadro 5.- Comparación de 2a con TOR1 de <i>S. cerevisiae</i> (aminoácidos)	35
Cuadro 6.- Comparación de 2a con TOR2 de <i>S. cerevisiae</i> (aminoácidos)	36

RESUMEN

Estudios llevados a cabo principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han revelado que existen tres tipos celulares en las levaduras gemantes, dos tipos celulares haploides (tipos sexuales **a** y α) y un tipo celular diploide (**a**/ α). Las células **a** y α producen péptidos extracelulares conocidos respectivamente como feromonas **a** y α , que actúan en un receptor que está presente únicamente en las células del tipo sexual opuesto. La unión de las feromonas **a** su receptor activa una vía de transducción de señales que en última instancia provoca la fusión o apareamiento de las células haploides para formar al diploide **a**/ α .

En la levadura *Kluyveromyces lactis* se conocen sólo algunos de los genes que determinan el tipo sexual y/o que están involucrados en el proceso de apareamiento, razón por la que con este proyecto se pretendía hacer la identificación de más de estos genes a través de distintas estrategias pero sobre todo por medio de un estudio de “despliegue diferencial”, con un especial interés por identificar los genes de los receptores para las feromonas.

El resultado del proyecto fue la identificación del gen (o uno de los genes) TOR de *Kluyveromyces lactis*, cuya expresión diferencial está aun por confirmarse. Por otro lado, se identificaron tres bandas de DNA que sólo son expresadas por el tipo sexual α y una banda más que se expresa solamente en el tipo sexual **a**. Las cuatro bandas prometen la identificación de los genes correspondientes, uno de los cuales probablemente codifique para una proteína de membrana (quizá uno de los receptores para feromonas) puesto que su secuencia presenta un alto porcentaje de identidad con quimiorreceptores de bacterias. Finalmente, se produjo una mutante en la subunidad β de la proteína G de *S. cerevisiae* que podrá utilizarse para identificar genes de la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis* por reversión del fenotipo estéril de la mutante al transformarla con una biblioteca de DNA genómico de *K. lactis* de la que se dispone.

INTRODUCCION

Las levaduras gemantes son organismos que, aunque son unicelulares, exhiben muchos de los procesos que son cruciales para el desarrollo de organismos multicelulares, tales como la especialización celular y las interacciones célula-célula (1).

En levaduras, las células especializadas juegan papeles distintos durante el ciclo de vida del organismo. Estudios llevados a cabo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han revelado que en ésta existen tres tipos celulares diferentes: los tipos sexuales a y α , que son típicamente haploides y están especializados para cruzarse o aparearse entre ellos y, el tipo celular diploide a/α , que resulta de la fusión o apareamiento de las dos células haploides y tiene la capacidad de llevar a cabo meiosis y esporular cuando no hay disponibilidad de nitrógeno (1) (Figura 1).

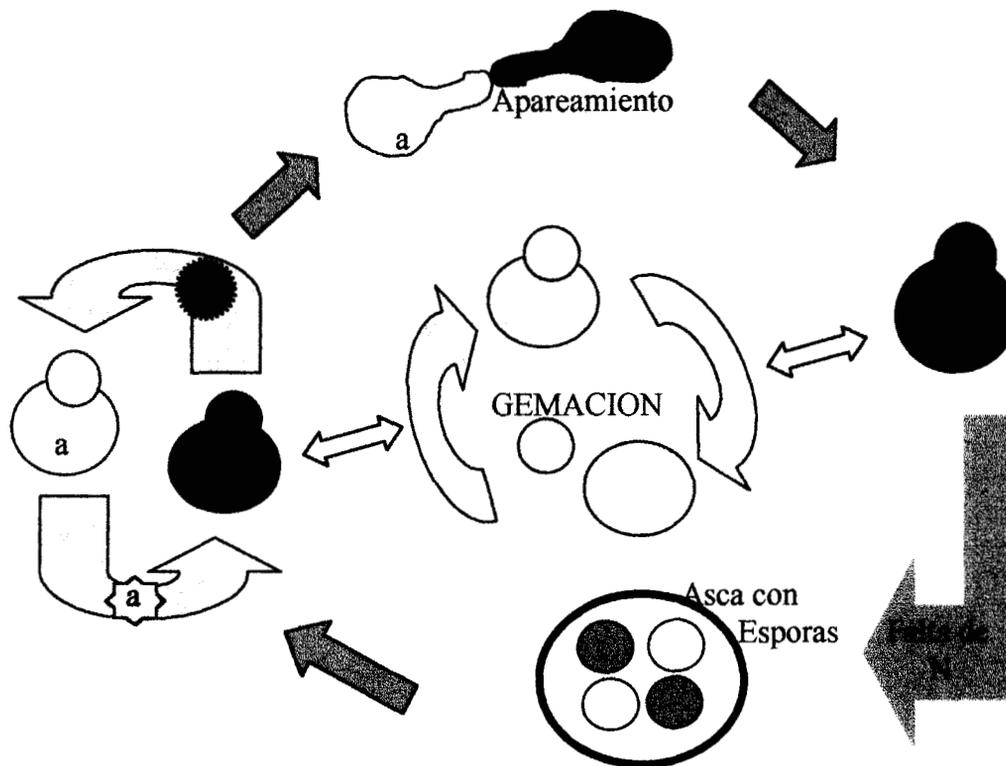


Figura 1.- Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. El ciclo de vida de *Kluyveromyces lactis* es similar, aunque en esta última no se han observado cambios morfológicos antes del apareamiento.

Se han definido cuatro clases de genes con base en su distinto patrón de expresión en los tres tipos celulares de levadura: los genes α -específicos (expresados solamente por células α), los genes a -específicos (expresados solamente por células a), los genes haploide-específicos (expresados sólo por los tipos haploides) y los genes esporulación-específicos (expresados sólo por células a/α y en condiciones de inanición) (Tabla 1). De estos grupos de genes, sólo el patrón de expresión de los últimos no está determinado directamente por productos del locus MAT (ver abajo) (1).

GENES	PRODUCTO	FUNCION
a-específicos	STE2 STE6 MFA1 y MFA2 BAR1	Receptor para feromona α Proteína necesaria para secreción de feromona a Componentes estructurales de la feromona a Proteasa de la feromona α
α -específicos	STE3 MF α 1 y MF α 2	Receptor para feromona a Componentes estructurales de la feromona α
Haploide específicos	STE4 STE5 STE12 STE18 KAR1 HO RME1 SCG1/GPA1	Necesarias para el apareamiento Necesario para fusión nuclear Necesario para cambio de tipo sexual Inhibe el inicio de la meiosis y es necesario para la transcripción de Ty1 Regula negativamente la vía de respuesta a feromonas
Esporulación específicos [sólo se expresan cuando no hay disponibilidad de nitrógeno (N)]	IME1 SPO12 SPO13 ---	Activador de eventos tempranos de meiosis Necesarios para una correcta segregación meiótica Gen para glucoamilasa específica de esporulación
Su expresión se induce sólo en presencia de feromonas	FUS1 FAR1 *	Necesario para fusión Inhibe a CDC28-CLN1 y CDC28-CLN2. Responsable de detener el ciclo celular en G1

Tabla 1.- Genes **a** específicos, α específicos, haploide específicos, esporulación específicos y exclusivos de respuesta a feromonas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (1). * Este gen tiene una expresión basal además de la inducida por la feromona.

Todas las diferencias entre los tres tipos celulares están determinadas por los alelos del locus del tipo sexual o locus MAT (del inglés Mating Type). Las células con el alelo MATa exhiben el tipo sexual a, las que tienen el alelo MAT α exhiben el tipo sexual α y las que tienen ambos alelos exhiben el fenotipo a/ α . Estos alelos codifican para componentes de proteínas reguladoras que gobiernan la expresión de grupos de genes que son clave para la especialización de la célula de levadura. Dichas proteínas reguladoras son proteínas de unión a DNA que se unen de manera específica a regiones reguladoras que están corriente arriba de sus genes blanco (1).

El locus MAT codifica tres polipéptidos componentes de proteínas reguladoras: a1 (codificado por MATa) y α 1 y α 2 (codificados por MAT α). α 1 es un regulador positivo de la transcripción de los genes α -específicos y por lo tanto es necesario para que se expresen, mientras que α 2 es un regulador negativo de la transcripción de los genes a-específicos, de manera que bloquea su expresión. Por su parte, a1 es importante en las células a/ α , en donde se une a α 2 para formar la proteína reguladora a1- α 2 (1,2), la cual detiene tanto la síntesis de α 1 como la expresión de los genes haploide-específicos (1) (Figura 2).

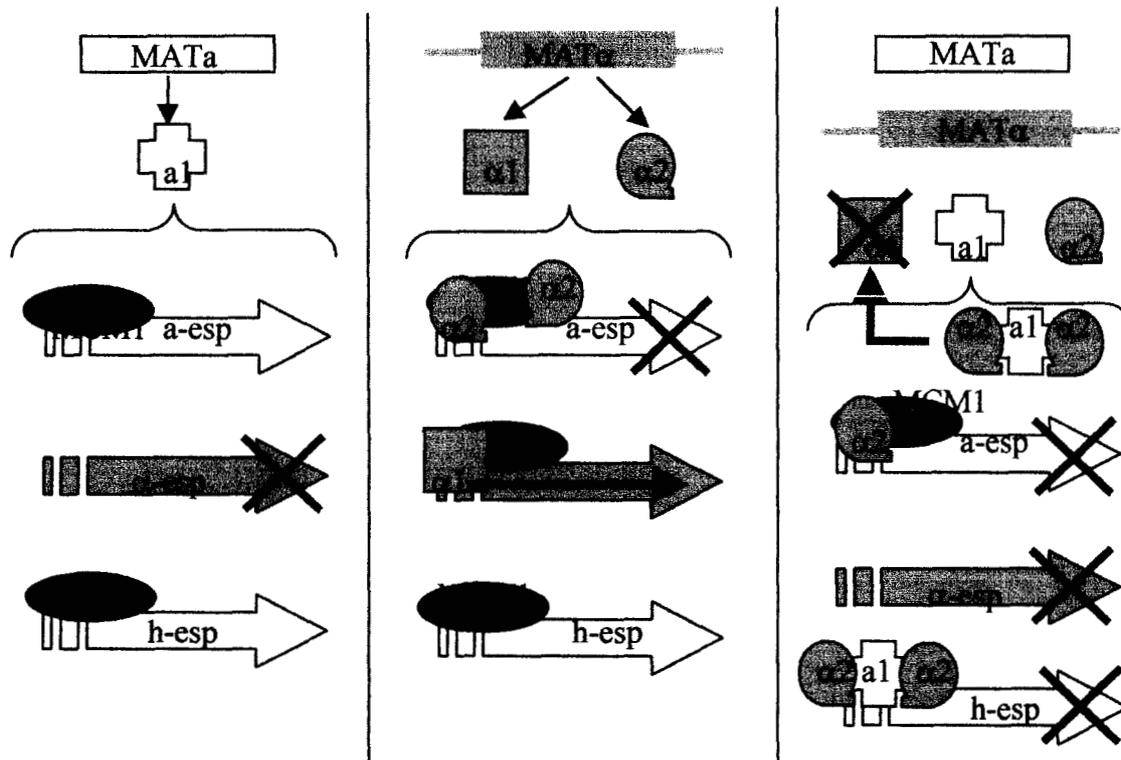


Figura 2.- Diagrama que muestra el control de la expresión de los genes a específicos (a-esp), α específicos (α -esp) y haploide específicos (h-esp) por el locus MAT. La columna del lado izquierdo corresponde a una célula a, la del centro a una célula α y la de la derecha a un diploide a/ α . El locus MAT y el alelo que posee aparecen en la parte superior de la figura, seguidos de sus productos y de los genes cuya expresión controlan (flechas gruesas). X significa represión de la transcripción y la flecha asociada a α 1 en la columna del centro significa activación de la transcripción.

Entre los tres tipos celulares de levadura hay muchas diferencias, de las que la más notable es quizá el hecho de que las células **a** y α tienen cada una un sistema de señalización distinto que les permite aparearse entre ellas. Las células α producen un péptido extracelular conocido como factor o feromona α que actúa en un receptor que está presente únicamente en las células **a**, mientras que las células **a** producen un péptido extracelular (factor o feromona **a**) que actúa en un receptor que sólo está presente en las células α . Por su parte las células **a**/ α no son capaces de aparearse y no producen ni responden a alguno de los factores (1) (Figura 1).

En presencia de células del tipo sexual opuesto la síntesis de las feromonas, de los receptores para ellas y, en realidad, la expresión de todos los genes **a**-específicos y α -específicos conocidos, se induce de 3 a 5 veces más con respecto al estado no inducido, siendo los factores de apareamiento los responsables de esa inducción (1).

Los receptores para los factores de apareamiento son receptores del tipo de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G: Ste2p en el caso de células **a** y Ste3p en el caso de células α (1,3). Cuando estos receptores se activan como consecuencia de la unión de su respectivo ligando, esto provoca la disociación de la proteína G trimérica acoplada ($\alpha\beta\gamma$), en la subunidad α [codificada por GPA1 (1)] y el dímero $\beta\gamma$ [β codificada por STE4 (1,4) y γ codificada por STE18 (1)] (5). El dímero $\beta\gamma$ es un complejo estable que está asociado a la membrana plasmática (6) y que, disociado de la subunidad α , activa una cascada de MAP cinasas que es necesaria para que las células respondan a la feromona y puedan aparearse. Aunque los receptores son específicos de tipo celular, todos los componentes intracelulares de la vía de respuesta a feromonas son comunes para los dos tipos celulares haploides (**a** y α) y, en el caso de las células diploides **a**/ α , ni los receptores ni varios de los otros componentes de la vía son sintetizados (5).

Según un modelo propuesto recientemente (7), la activación de la vía de respuesta a feromonas por $\beta\gamma$ se da gracias a que este dímero recluta hacia la membrana plasmática a una proteína que predominantemente se localiza en el núcleo, conocida como Ste5p. A esta proteína están asociadas las cinasas Ste11p (MAPKKcinasa), Ste7p (MAPKcinasa) y Fus3p (MAPcinasa), que son activadas por medio de fosforilación secuencial en el orden mencionado como resultado de su cercanía a la membrana (Figura 3). De acuerdo al modelo, esa activación es probablemente el resultado del acercamiento de este módulo de cinasas a las proteínas activas Ste20p [PAcinasa (o PAK) que se ha observado que interactúa con β (3)], Cdc24p y Cdc42p, de las cuales la primera es la que seguramente activa y fosforila directamente a Ste11p y por lo tanto a la cascada. De cualquier forma, una vez que la MAPcinasa Fus3p está activa, a su vez fosforila al factor de transcripción Ste12p que, a menudo junto con el factor transcripcional general MCM1, activa la transcripción de genes que codifican para componentes de la respuesta a feromonas (e.g. FAR1) y genes necesarios para la fusión celular [e.g. FUS1 (1)] (5). Estudios con los genes de *Kluyveromyces lactis* homólogos a STE12 y al gen que codifica para $\alpha 1$ de *Saccharomyces cerevisiae*, expresados en esta última levadura, revelaron que en el caso de los genes **a**-específicos la activación de la transcripción no depende de proteínas codificadas por MAT, sino de MCM1 y STE12, siendo STE12 el componente que responde a feromonas; mientras que en el caso de los genes α -específicos, el sitio de unión de $\alpha 1$ y MCM1 confiere tanto la especificidad de tipo celular como la activación de la transcripción por la feromona **a**, pero ambas actividades transcripcionales dependen también de STE12, que media la inducción de la transcripción de esos genes en respuesta a feromona a través de una interacción

celular en G1, formación de shmoo (nombre que se da a la morfología característica de las levaduras que van a aparearse por su similitud a la de un personaje de caricaturas con ese nombre (13)), selección de pareja de apareamiento y restauración del crecimiento mitótico si el apareamiento no ocurre. A esas respuestas también contribuye pero en menor grado la MAPcinasa Kss1p, que también es fosforilada y activada como consecuencia de la activación de la vía de respuesta a feromonas (Figura 3) (14).

En resumen, los efectos que las feromonas tienen en las células sirven para coordinar y facilitar el apareamiento (1), siendo las tres respuestas principales: inducción de la transcripción de genes involucrados en el apareamiento, detención del ciclo celular en fase G1 y cambios morfológicos (5). De estas respuestas, la detención del ciclo celular en G1 parece requerirse, no para que las células maduren del estado vegetativo al cigótico (fenómeno que sí ocurre), sino para que las células que van a aparearse se sincronicen (15).

Es importante mencionar que aunque las células α y α son haploides, en realidad poseen la información de los dos alelos MAT, sólo que únicamente un alelo ocupa el locus MAT y es por lo tanto activo. Además del alelo que está activo existen dos loci crípticos adyacentes al locus MAT: el locus HML, que generalmente codifica para MAT α y, el locus HMR, que generalmente codifica para MAT α . La información en estos loci es capaz de sustituir a la copia activa en el locus MAT por medio de un rearrreglo genético que es iniciado por una endonucleasa sitio específica, codificada por el gen HO. Este rearrreglo resulta en un cambio del tipo sexual en la célula de levadura porque el alelo del locus MAT es reemplazado por el alelo MAT del tipo sexual opuesto que estaba en uno de los loci crípticos adyacentes. El gen HO se expresa sólo en células haploides (regulación negativa de su expresión por α 1- α 2), sólo en fase G1 tardía (regulación por el factor de unión a DNA CCBF) y sólo en células madre (regulación por Ash1p (9)) (1) (Figura 4).

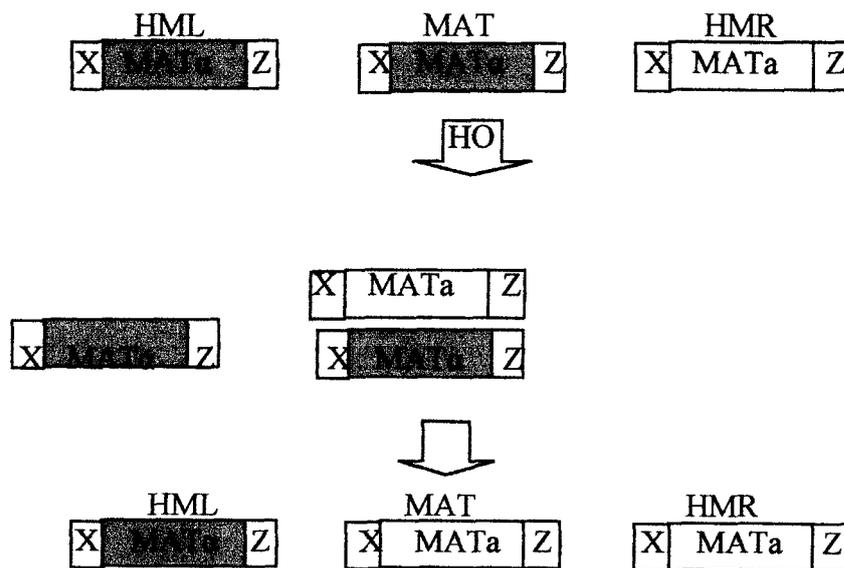


Figura 4.- Interconversión del tipo sexual en *S. cerevisiae*. La información del locus MAT puede ser cambiada por la del tipo sexual opuesto, que en este caso se encuentra en el locus críptico HMR, a través de un rearrreglo genético que es iniciado por la endonucleasa sitio específica HO. X y Z son secuencias homólogas en todos estos loci.

ANTECEDENTES

Kluyveromyces lactis y *Saccharomyces cerevisiae*

La información presentada en la introducción es el resultado de las investigaciones que acerca de este tema se han llevado a cabo sobre todo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, en la levadura *Kluyveromyces lactis* se conocen poco los mecanismos moleculares responsables del apareamiento y la determinación del tipo sexual. No obstante, hay muchas razones que hacen pensar que esos mecanismos pueden ser muy similares en las dos levaduras. A continuación se exponen algunas de esas razones.

K. lactis y *S. cerevisiae* son dos organismos muy cercanos filogenéticamente (16,17,18,19,20) puesto que ambos son levaduras ascosporógenas que pertenecen a la subfamilia *Saccharomycetoideae* (16); de hecho, antes se clasificaba a *K. lactis* como *Saccharomyces lactis* (21). Las cepas de *K. lactis* son generalmente heterotálicas, con tipos sexuales que se han denominado α y α (22). El ciclo de vida de *K. lactis* y *S. cerevisiae* es esencialmente similar, aunque con las siguientes diferencias: primero, en *K. lactis* la fase diploide es transitoria; es decir, los diploides espontáneamente entran en meiosis y esporulan, mientras que los haploides son estables (22,17,23) y, segundo, en cultivos de apareamiento *K. lactis* no muestra morfología shmoo, sin embargo, el número de células en gemación se reduce de 2 a 3 veces, lo que sugiere una detención del ciclo celular inducida por la pareja de apareamiento (24).

Se sabe también que en muchos casos en los que los genes encontrados en *K. lactis* tienen homólogos en otras especies, la conservación de su secuencia con respecto a la de los de *S. cerevisiae* es mucho más alta que con respecto a la de los demás organismos (25). Es más, no sólo hay homología de genes sino similitud en el orden relativo dentro del genoma (sintenia) de los genes funcionalmente equivalentes (17,19,25,26,27.), de hecho, hay algunos casos en los que genes vecinos en *K. lactis* tienen cada uno un par de homólogos en *S. cerevisiae*, cada uno de los cuales se localiza en una de las dos regiones que se cree representan una duplicación genómica ancestral en esta última levadura (19,25). Además de esto, las dos levaduras tienen genomas que se parecen en el tamaño [aunque no en el cariotipo (*K. lactis*→6 cromosomas, *S. cerevisiae*→16 cromosomas (17,28))], en la densidad génica, en la presencia de regiones intergénicas cortas, en el número de genes, en la estructura de los centrómeros y en la rara ocurrencia de intrones (que inclusive tienen una posición conservada, al menos en los genes para RNAt (26)) (25).

De manera particular, las razones que hacen pensar en mecanismos moleculares similares para el apareamiento y la determinación del tipo sexual entre *K. lactis* y *S. cerevisiae* son los hallazgos de genes de *K. lactis* con homología a los genes de *S. cerevisiae* responsables de dichos mecanismos. Esos genes incluyen a los que codifican para $\alpha 1$ y Ste12p (8), al gen de la feromona α (29) y a dos genes que codifican para subunidades α de proteínas G (24,30), una de las cuales (KlGpa1p) funciona como un elemento de control positivo en la vía de respuesta a feromonas y parece requerirse para una correcta esporulación de los diploides (24) (Figura 5). Un estudio reciente de exploración al azar del genoma de *K. lactis* y su comparación con el de *S. cerevisiae*, ha revelado homología entre secuencias que seguramente corresponden a las de los genes de *K. lactis* que son homólogos a los genes de *S. cerevisiae* STE23, SIN4, KSS1, RME1,

CLN1 y CLN2, todos los cuales están directa o indirectamente involucrados con el apareamiento y/o la determinación del tipo celular (25). Resultados aun más recientes (26) prometen identificar más elementos participantes en estos fenómenos.

Finalmente, otra evidencia a favor de la similitud de los mecanismos de las dos levaduras es la demostración de que *K. lactis* tiene un locus crítico que contiene al gen $\alpha 1$ y de que este locus es silenciado por el homólogo funcional de una de las proteínas encargadas de silenciar los loci críticos del tipo sexual en *S. cerevisiae*; a saber, el homólogo de Sir4p (17,23).

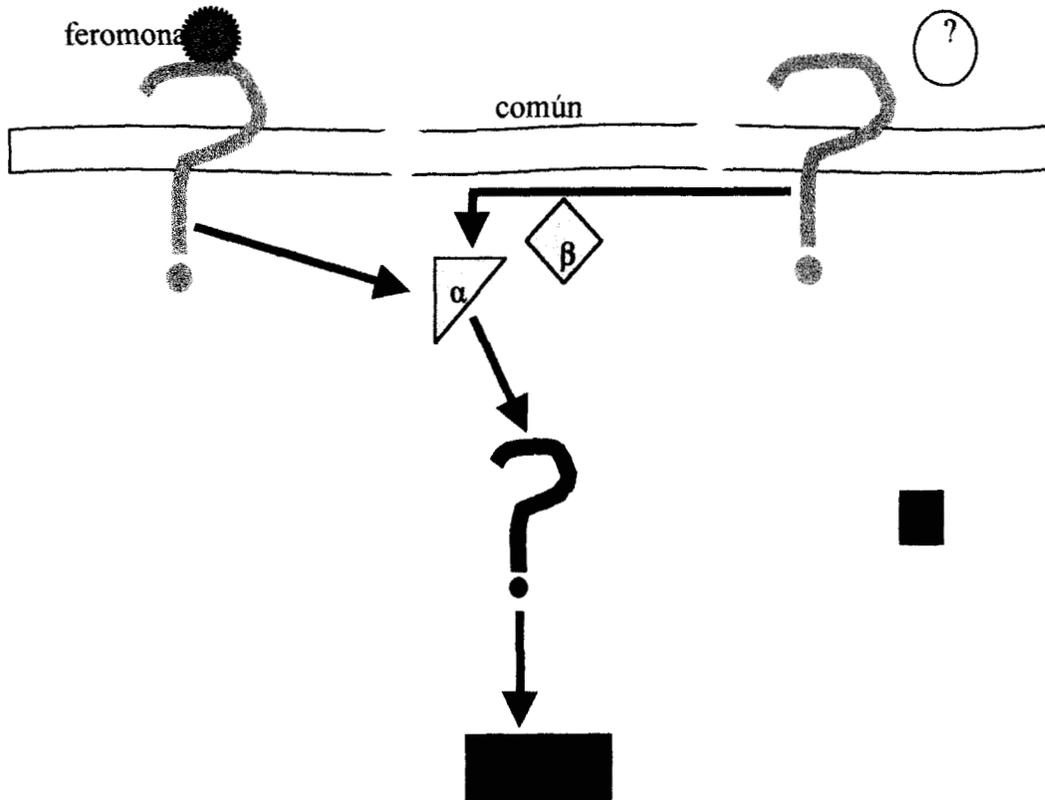


Figura 5.- Componentes conocidos de la vía de respuesta a feromonas en *Kluyveromyces lactis* (Izquierda= *K. lactis* a, derecha= *K. lactis* α , centro= común a los dos tipos sexuales). La subunidad α de proteína G que se presenta es KIGpa1p.

¿Por qué *Kluyveromyces lactis*?

Al igual que *S. cerevisiae*, *K. lactis* es una levadura de interés biotecnológico (25) que ha sido utilizada con éxito para la expresión a gran escala de productos génicos importantes (17), además de ser un organismo que ofrece ventajas con respecto a otros para la expresión de genes heterólogos (Tabla 2). Por otro lado, la muy bien desarrollada genética molecular de *S. cerevisiae* se puede aplicar a ella gracias a la cercanía que existe entre las dos, de manera que es posible la utilización en *K. lactis* de promotores y marcadores de selección de *S. cerevisiae*, además de los propios (17,21,31). Es más, las

herramientas moleculares que se han desarrollado para *K. lactis* en los últimos años permiten trabajar con ella casi como con *S. cerevisiae* (17). Ahora, en diversos estudios de expresión de proteínas heterólogas se ha observado que *K. lactis* es superior a *S. cerevisiae* tanto en rendimiento como en eficiencia de secreción (17,21,31,32), además de que es tan buena o mejor que ella en frecuencia de transformación, capacidad de glicosilación, estabilidad de plásmidos y crecimiento (32). Adicionalmente, otra ventaja de *K. lactis* es que el plásmido pKD1 [original de *K. drosophilum* y similar al de $2\mu\text{m}$ de *S. cerevisiae* (21)] y los vectores que de él se derivan, tienen un mayor rango de hospedero que el de $2\mu\text{m}$ y sus vectores, dentro del género *Kluyveromyces* (17).

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Yarrowia lipolitica</i>	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
En uso para la producción de enzimas industriales	+	+	+	-	-
Organismo catalogado por la FDA* como GRAS**	+	+	-	-	-
Fermentación a alta densidad	+/-	+	+	+	+
Requerimiento de fermentador a prueba de explosiones.	-	-	-	+	+
Buena secreción	-	+	+	+	+
Hiperglicosilación	+	-	-	-	-
Facilidad de manipulación genética	+	+/-	-	-	-
Vectores episomales estables	+	+	-	-	-

Tabla 2.- Algunas características de especies de levadura utilizadas para la expresión de genes heterólogos (21). *Food and Drug Administration. **Generally Recognized As Safe.

Finalmente, uno de los sistemas con potencial de uso como vector en *K. lactis* es el conformado por los plásmidos killer pGKL1 y pGKL2 (17,21). Se ha observado que estos plásmidos son estables en células de *S. cerevisiae* con DNAm^t deficiente y que se pierden con frecuencia en los diploides debido a que, al parecer, $\alpha 1-\alpha 2$ actúa sobre pGKL2 controlando su estabilidad. Este control de la estabilidad de los plásmidos killer por MAT en *S. cerevisiae* no se observa en *K. lactis*, lo que sugiere que en esta levadura la naturaleza del represor o la secuencia que éste reconoce son diferentes (33). Esto último posiblemente tiene que ver con resultados obtenidos por Astrom y Rine (23), en donde la expresión simultánea de información α y α en *K. lactis* no resulta en una incapacidad absoluta de las células para aparearse, sugiriendo que $\alpha 1-\alpha 2$ en *K. lactis* no reprime completamente a los genes haploide específicos y/o a $\alpha 1$ (a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*). Esta relación que aparentemente existe entre el locus MAT y la estabilidad de plásmidos que pueden ser útiles como vectores, resalta la importancia de estudiar el apareamiento, la determinación del tipo sexual y en general la genética y biología molecular de *K. lactis*; no sólo por el interés en el conocimiento de este organismo, sino por su utilidad como una herramienta biotecnológica.

OBJETIVO

Identificar genes de los dos tipos celulares haploides de la levadura gemante *Kluyveromyces lactis* cuya expresión es diferencial y que están involucrados en su proceso de apareamiento y/o en la determinación de sus tipos sexuales respectivos α y a .

HIPOTESIS

Los dos tipos celulares haploides de la levadura *Kluyveromyces lactis* tienen diferencias fenotípicas que son el resultado de su especialización como tipos sexuales distintos con la capacidad de aparearse entre ellos; por lo tanto, un estudio de la expresión génica en esos dos tipos celulares revelará cuales son los genes que se expresan diferencialmente en ellos y que participan en la determinación de los distintos fenotipos.

JUSTIFICACION

El estudio que se plantea permitirá identificar genes específicos de cada tipo celular que participan en el proceso de apareamiento y/o en la determinación del tipo sexual de *K. lactis*. Lo anterior será una aportación al conocimiento de esta levadura, que permitirá a largo plazo el mejoramiento de su utilización como un sistema de expresión de genes eucariotes heterólogos y, de manera general, contribuirá a un mejor entendimiento de los mecanismos de regulación de la expresión génica que son responsables de la diferenciación celular en eucariotes.

Cepas y medios de cultivo

Levaduras: *Kluyveromyces lactis* WM27 (*MAT α* , *lysA*), *K. lactis* WM37 (*MAT α* , *hisA*), *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (*Mata*, *Ade1*, *His3*, *Leu2*, *Trp1* y *Ura3*) y *S. cerevisiae* 70 (*MAT α* , *Met*, *Thr*).

Bacterias: *Escherichia coli* DH5 α [*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17(r κ m κ)*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argFV169*), ϕ 80 δ *lacZ* Δ *M15*, F⁻, λ].

Medios para levaduras: YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona de gelatina 1% y Dextrosa 2%), SD (Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.7%, Dextrosa 2%), SD + Ade, His, Trp y Ura (20 μ g/ml de c/u) y SD + Ade, His y Trp (20 μ g/ml de c/u). En todos los casos en los que se usó medio sólido se usó agar al 2%.

Medios para bacterias: Luria Bertani con/sin Ampicilina [LB (Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%), ampicilina 60 μ g/ml]. El medio sólido con agar al 2%.

Extracciones de DNA de levaduras

- Cultivo de levaduras en 25ml de medio YPD, a 30°C y con agitación constante durante toda la noche.
- Cosecha de las células por centrifugación a 3000rpm/5min. y resuspensión en 1ml de agua destilada estéril (dH₂Oe).
- Transferencia de las células a dos tubos eppendorf de 1.5ml y cosecha por microcentrifugación durante 5 segundos. A partir de este punto se da el mismo tratamiento a los dos tubos.
- Decantación del sobrenadante y agitación de los tubos en un vórtex para resuspender las células en el líquido residual.
- Adición de 200 μ l de solución QTP (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 10mM, Tris-Cl 10mM (pH=8), Na₂ EDTA 1mM), luego 200 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y finalmente 0.3g de perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro lavadas con ácido.
- Agitación de la mezcla en un vórtex por 4min. y adición de 200 μ l de dH₂Oe.
- Microcentrifugación por 5min. y transferencia de la fase acuosa resultante a tubos nuevos a los que se añade 1ml de etanol 100%; mezcla por inversión.
- Microcentrifugación por 2min, se desecha el sobrenadante y el botón se resuspende en 400 μ l de dH₂Oe + 3 μ l de una solución de RNasa A 10mg/ml. Incubación a 37°C/5min. Adición de 10 μ l de acetato de amonio 4M y 1ml de etanol 100%; mezcla por inversión.
- Microcentrifugación por 2min, se desecha el sobrenadante y el botón se seca al aire por 10min. Resuspensión en 50 μ l de dH₂Oe.

Extracciones de RNA de levaduras

Cultivo de las cepas en 20ml de YPD a 30°C y durante toda la noche con agitación constante. A partir del cultivo de toda la noche, inicio de otro cultivo de cada cepa en 25ml de medio, empezando con una densidad celular cuya absorbancia a 600nm (A_{600}) es de 0.2 y finalizando con A_{600} = 0.6 . Extracción por el método Phenol/Freeze RNA Prep:

- Centrifugación de las células (5000rpm/10min), resuspensión en 400µl de H₂O-DEPC (DEPC=dietil pirocarbonato) y transferencia a tubo eppendorf.
- Microcentrifugación y resuspensión en 400µl de amortiguador AE (Acetato de Sodio 50mM pH= 5.3, EDTA 10mM), adición de 40µl de SDS 10% y 1 volumen de fenol ácido.
- Agitación en vórtex e incubación a 65°C/4min.
- Enfriamiento en baño de hielo seco-etanol por 15seg y microcentrifugación a temperatura ambiente (T.amb.) por 2min.
- Transferencia de la fase acuosa a un tubo nuevo, adición de un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), agitación en vórtex y microcentrifugación por 5min. a T. amb.
- Transferencia de la fase acuosa a un tubo nuevo, adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH= 5.3) y 2.5 volúmenes de etanol. Precipitar a -20°C durante 20min.
- Microcentrifugación por 5min., lavado con etanol al 80%, desecho del sobrenadante (Sn.), secado del botón al aire por 3min. y resuspensión del mismo en 20µl de H₂O-DEPC.

Ensayos de Hibridación

Southern Blot (36):

- Digestión de DNA con enzimas de restricción.
- Electroforesis de los productos de la digestión en geles de agarosa al 1%.
- Desnaturalización del DNA del gel en solución desnaturalizante (NaCl 1.5M y NaOH 0.5N) por 30min.
- Neutralización con solución neutralizante (NaOH 1.5M y TRIS-HCl 1M pH=8.0) por 30min.
- Transferencia del DNA a membranas de nylon (Hybond-N, amersham farmacia biotech) por capilaridad.
- Fijación del DNA a las membranas por entrecruzamiento con luz UV.
- Hibridación (16 a 24 horas) utilizando una mezcla que contiene amortiguador SSC 6X, reactivo Denhardtts 5X, SDS 0.1%, 200mg de DNA de esperma de salmón y la sonda deseada.
- Lavado de 15min. en SSC 5X-SDS 0.1% y lavado de 15 min. en SSC 2X-SDS 0.1%.
- Exposición de la membrana a una placa fotográfica y/o a la placa del STORM (STORM 840, Accesolab).

Northern Blot y Dot Blot (36):

- Electroforesis de RNA en geles de agarosa al 1%, lavado de los geles en agua destilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (dH₂Oe-DEPC) y transferencia del RNA a membranas de nylon por capilaridad (Northern Blot). Desnaturalización de RNA con formaldehído y transferencia a membranas de nylon utilizando el dispositivo de succión MINIFOLD I (Schleider y Schuell) (Dot Blot).
- Fijación del RNA a las membranas por entrecruzamiento con luz UV.
- Hibridación a 60°C y durante 16 a 24 horas con una mezcla que contiene amortiguador SSC 6X, reactivo Denhardts 2X, SDS 0.1%, 2mg de DNA de esperma de salmón y la sonda que se desee.
- Lavados a 65°C en SSC 1X-SDS 0.1%.
- Autoradiografía de la membrana en una película fotográfica o con la placa del STORM (STORM 840, Accesolab).

Hibridación en colonias:

- Transferencia de colonias bacterianas a membranas de nylon (réplica en membranas de nylon).
- Lisis de las colonias en solución desnaturalizante (NaCl 1.5M y NaOH 0.5N) durante 5 minutos.
- Neutralización en solución neutralizante (NaOH 1.5M y TRIS-HCl 1M pH=8.0) durante 5 minutos.
- Lavado de las membranas con SSC 2X, quitando con cuidado el material celular visible.
- Fijación del DNA por entrecruzamiento con luz UV.
- Hibridación y revelado como en el Southern Blot.

Marcaje de sondas

Los fragmentos de DNA que son utilizados como sondas se marcan con ³²P de acuerdo con el protocolo del sistema de marcaje de DNA “Random Primers DNA Labeling System” de Life-Technologies (Cat. No. 18187-013). A grandes rasgos lo que se hace es lo siguiente:

- Desnaturalización de DNA hirviéndolo en un baño de agua durante 5 minutos.
- Adición de dATP, dGTP, dTTP, iniciadores (hexámeros incluidos en el producto) y [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l).
- Adición de fragmento Klenow de la DNAPol I e incubación a 25°C durante 1hr.
- Adición de amortiguador “stop”.

Purificación de DNA de geles de agarosa

Estas purificaciones se llevan a cabo con el kit GeneClean de BIO 101, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor:

- Corte de la banda de interés del gel de agarosa.
- Adición de ½ volumen de “TBE modifier” y de 4.5 volúmenes de NaI.
- Incubación a 55°C hasta derretir el gel.
- Adición de solución “glassmilk”.
- Microcentrifugación del complejo glassmilk-DNA.
- Lavado del botón con “NewWash”.
- Elución del DNA con dH₂Oe

Ligación de moléculas de DNA

- Incubación durante toda la noche, a 16°C, de una mezcla que contenga los fragmentos de DNA que se quieren ligar y la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 en su amortiguador correspondiente.

Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α

- Mezcla de células competentes con reacción de ligación.
- Incubación en hielo por 30min.
- Incubación a 42°C/3min. (Choque Térmico).
- Adición de medio LB.
- Incubación a 37°C/1hr.
- Microcentrifugación durante 5 segundos.
- Resuspensión del botón celular en agua destilada estéril (dH₂Oe) y, si es el caso, adición de IPTG (isopropil tiogalactósido) y X-Gal. Mezcla con pipeta.
- Siembra en cajas petri con agar LB-ampicilina.

Construcción de bibliotecas

Biblioteca Genómica:

- Digestión parcial de DNA genómico con la enzima *Sau3a*.
- Electroforesis de los productos de la digestión en geles de agarosa al 1%.
- Purificación de los fragmentos de tamaño entre 1 y 2 kilobases.
- Ligación de los fragmentos en el sitio *Bam*HI del plásmido pEG202.
- Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α.

Biblioteca de cDNA:

A partir de RNA total se purifica mRNA utilizando el kit "mRNA Isolation System" (BRL, Life Technologies, Inc.) cuyo principio es una cromatografía en columnas de oligo-dT celulosa. Posteriormente se produce cDNA a partir del mRNA, utilizando el kit "ZAP-cDNA SYNTHESIS" (STRATAGENE). Este kit permite generar moléculas de cDNA que pueden ser introducidas direccionalmente en un vector apropiado por poseer un extremo cohesivo *EcoRI* y otro *XhoI*. A grandes rasgos el protocolo es el siguiente:

- Síntesis de la primera cadena de DNA utilizando 5-metil dCTP en lugar de dCTP en la mezcla de retrotranscripción y un oligonucleótido de 50 bases que incluye un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* (secuencia subrayada) y cuya secuencia es

5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'

- Síntesis de la segunda cadena utilizando $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP en la mezcla de reacción que además contiene RNasa H y DNA pol I.
- Generación de extremos romos en el cDNA utilizando T4 DNA pol.
- Ligación, en los extremos del cDNA, de adaptadores *EcoRI* con secuencia:

5' AATTCGGCACGAG 3'
3' GCCGTGCTC 5'

- Fosforilación de los extremos *EcoRI* con T4 polinucleótido cinasa.
- Digestión con *XhoI* que genera moléculas de cDNA con un extremo cohesivo *EcoRI* y otro *XhoI*, el último de los cuales se produce cuando la enzima corta en el sitio de corte homónimo que fue generado durante la retrotranscripción. La enzima no corta en otro sitio gracias a la protección que resulta de la metilación de los nucleótidos de citosina.
- Purificación del cDNA en columnas de Sephacryl S-400 (tres fracciones).

Una vez que se tiene el cDNA, ligación al vector pJG4-5 previamente cortado con *EcoRI-XhoI* y desfosforilado.

Finalmente, transformación de células SURE competentes con los productos de la ligación (igual que la transformación de *E. coli* DH5 α).

Transformación de levaduras

A partir de un cultivo de toda la noche (~10ml de YPD) de la levadura a transformar, se inicia otro cultivo en ~20ml de YPD con una $A_{600} = 0.2$. La transformación se inicia cuando su $A_{600} = 0.6$:

- Centrifugación del cultivo a 2500rpm/5 minutos.

- Resuspensión del cultivo en 2ml de dH₂Oe. Simultáneamente se pone a hervir DNA de esperma de salmón (50µg) durante 5 minutos e inmediatamente después se enfría en hielo.
- Transferencia de las células resuspendidas a 2 tubos eppendorf (1ml a cada tubo) y microcentrifugación durante 5 segundos.
- Lavado de los paquetes celulares con 1ml de TE/LiOAc recién preparado [1ml de TE 10X (Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM, pH=7.5) + 1ml de LiOAc 10X (Acetato de Litio 1M, pH=7.5) + 8ml de dH₂Oe].
- Resuspensión de las células en 100µl/tubo (1/100 del volumen de cultivo original) de TE/LiOAc.
- Mezcla de 50µl de las levaduras (se pueden hacer 4 transformaciones) con ~1µg del DNA transformante y 10µg de DNA de esperma de salmón previamente hervido.
- Adición de 300µl de PEG/LiOAc recién preparado [1ml de TE 10X (Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM, pH=7.5) + 1ml de LiOAc 10X (Acetato de Litio 1M, pH=7.5) + 8ml de Polietilenglicol (PEG) 4000, 50%] y mezcla con pipeta.
- Agitación a 250rpm durante 30 minutos y a 30°C.
- Adición de 40µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada uno de los tubos y mezcla con pipeta.
- Choque térmico incubando las suspensiones celulares a 42°C durante 15 minutos.
- Microcentrifugación de los tubos durante 5 segundos y resuspensión de las células en 150µl de dH₂Oe.
- Siembra de las células en placas con medio selectivo apropiado e incubación a 30°C hasta que aparezcan colonias (2 a 3 días).

Ensayos de Apareamiento

- Cultivo en parches de las cepas que se quieren probar, en medio selectivo, durante 24 horas.
- Cultivo en césped (cultivo que cubre toda la superficie del agar) de la cepa del tipo sexual opuesto, en YPD, durante 24 horas.
- Transferencia de ambos cultivos, por réplica, a una placa de YPD e incubación a 30°C durante 5 horas para permitir el apareamiento de las células.
- Selección de diploides por réplica en placas de SD e incubación a 30°C hasta que aparezcan colonias (alrededor de 2 días).

Despliegue diferencial

Se llevó a cabo utilizando el kit RNAmTM de GenHunter Corporation (Cat. No. M501) pero siguiendo la metodología reportada por Rompf y Kahl en 1997 (34) que es una modificación de la metodología original desarrollada por Peng Liang y Arthur B. Pardee en 1992 (35). Descripción:

- Retrotranscripción del mRNA utilizando 4 iniciadores oligo-dT que tienen degenerada la segunda base a partir de 3' (T12MG, T12MA, T12MT Y T12MC) y la transcriptasa reversa MMLV. Las condiciones de la retrotranscripción son: 65°C/5min, adición en hielo de transcriptasa reversa, 37°C/60min, 95°C/5min, enfriado en hielo y microcentrifugación (pulso).
- Amplificación por PCR de las moléculas de cDNA obtenidas, utilizando *Taq* polimerasa, los mismos iniciadores 3' utilizados en la retrotranscripción y los siguientes decámeros 5' *: AP-1 (5'-AGCCAGCGAA-3'), AP-2 (5'-GACCGCTTGT-3'), AP-3 (5'-AGGTGACCGT-3'), AP-4 (5'-GGTACTCCAC-3') y AP-5 (5'-GTTGCGATCC-3'). Las condiciones para PCR son: 94°C/30seg., 40 ciclos de 94°C/30seg., 42°C/40seg. y 72°C/40seg, 72°C/5min y 4°C.
- Electroforesis de las muestras equivalentes resultantes de la amplificación del cDNA de cada cepa, las de una cepa al lado de las de la otra, en geles largos de agarosa al 1.6% con bromuro de etidio 0.3µg/ml (de aproximadamente 20cm)
- Identificación de los genes que se expresan diferencialmente como bandas que aparecen en el carril correspondiente al cDNA de una de las cepas pero no en el adyacente, que corresponde al de la otra cepa.
- Corte y purificación de las bandas de interés del gel.
- Reamplificación de las bandas purificadas, en las mismas condiciones en las que se amplificó la primera vez, pero en esta ocasión se dan 60 ciclos en lugar de 40.
- Electroforesis de los productos de la reamplificación en un gel corto de agarosa al 1.6% con bromuro de etidio 0.3µg/ml (de aproximadamente 8cm).
- Confirmación del tamaño correcto de las bandas reamplificadas por comparación con el tamaño de las de la amplificación original.
- Clonación de los fragmentos de DNA que resultan de la reamplificación en el vector pCRTMII de Invitrogen Corporation, según el protocolo indicado por el proveedor.
- Ensayos de Northern Blot y/o Dot Blot utilizando como sondas a los fragmentos clonados en pCRTMII, para confirmación de la expresión diferencial.

* Los decámeros 5' deben ser de secuencia arbitraria porque se ha visto que iniciadores de este tamaño pueden amplificar DNA que proviene de entre 50 y 100 diferentes moléculas de RNAm, que es un número óptimo para la electroforesis en un gel de secuenciación (35).

Secuenciación

La secuenciación de DNA fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Análisis de secuencias de DNA

Todas las secuencias de DNA fueron analizadas y comparadas con la base de datos genEMBL (GeneBank) utilizando el programa GCG (Genetics Computer Group, Inc. Madison Wisconsin).

RESULTADOS y DISCUSION

Puesto que el objetivo del proyecto es la identificación de genes con expresión diferencial que participan en la determinación de los distintos tipos sexuales y/o en el proceso de apareamiento de los dos tipos celulares haploides de *K. lactis* y considerando que en el laboratorio hay un especial interés en encontrar los genes de los receptores de las feromonas, se utilizaron varias estrategias que podrían llevar a esa identificación. Las estrategias planteadas fueron ensayos de despliegue diferencial y ensayos de hibridación de material genético de *K. lactis* con genes relevantes (para este estudio) de *S. cerevisiae*. En los últimos, el material genético consistió en DNA genómico de *K. lactis* digerido con diferentes enzimas de restricción o DNA obtenido a partir de bibliotecas de esa levadura en donde las secuencias con potencial para hibridar están amplificadas.

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a las distintas estrategias utilizadas, de las cuales el despliegue diferencial sirvió para la identificación del gen TOR de *K. lactis*.

Identificación de genes de *K. lactis* por homología con genes de *S. cerevisiae*

Como ya se mencionó, dentro de los genes con expresión diferencial en los dos tipos sexuales de *K. lactis* se tiene especial interés en identificar los que codifican para los receptores de las feromonas. Por otro lado, se sabe que en la levadura de fisión archiascomycete *Schizosaccharomyces pombe*, que es un organismo muy distante de los distintos grupos de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (18) y en particular de *S. cerevisiae* (25) y *K. lactis* (19), existe un sistema de apareamiento semejante al de *S. cerevisiae* en el que los genes de los receptores para feromonas, conocidos como MAM2 y MAP3⁺, tienen una identidad de 26.3% y 20.0% en sus secuencias de aminoácidos con los receptores para feromona α y para feromona a de *S. cerevisiae*, respectivamente (37,38). Tomando en cuenta lo anterior y sabiendo de antemano que *K. lactis* y *S. cerevisiae* son muy cercanas filogenéticamente (16,17,18,19,21,22,25,26,27), lo primero que se llevó a cabo con el fin de clonar los genes de los receptores para feromona de *K. lactis* fueron ensayos de Southern Blot con DNA de esa levadura, digerido con varias enzimas, utilizando como sondas al gen del receptor para la feromona α (STE2) de *S. cerevisiae* y un fragmento de 825pb del gen del receptor para la feromona a (STE3) de esa misma levadura. La sonda STE2 se obtuvo por digestión del plásmido pTZ18R/STE2 (previamente construido en el laboratorio) con las enzimas de restricción *Nco* I y *Asp* 718 (Figura 6A), a diferencia de la sonda STE3, que al no estar disponible en el laboratorio tuvo que amplificarse por PCR a partir de DNA de *S. cerevisiae*. Para llevar a cabo esa amplificación, primero se obtuvo la secuencia del gen STE3 (secuencia del GeneBank con número de acceso X03011) utilizando el programa GCG y, a partir de ella, se diseñaron los oligonucleótidos 5'-GGCATATCATGTGCCGTTAC-3' y 3'-GAGGGACACATCCATGTGGT-5' con los que finalmente se obtuvo el fragmento de 825pb. El fragmento empieza en el nucleótido 1166 y termina en el nucleótido 1990 de la secuencia mencionada y comprende a la parte media del gen que, por codificar para las regiones transmembranales del receptor, puede estar más conservada en otros receptores del mismo tipo. En la figura 6B se muestran los productos de PCR obtenidos con distintas concentraciones de MgCl₂ y con las siguientes condiciones

en la reacción: 94°C/5min., 50 ciclos de 94°C/45seg. + 58°C/1min. + 72°C/1min. y 72°C/10min.

En el ensayo de Southern Blot de la figura 7A se observa una señal de hibridación con la sonda STE2 (hibridación a una temperatura de 40°C y lavado de las membranas a 50°C); sin embargo, esta señal es muy tenue y corresponde a DNA de tamaño demasiado grande para poder ser clonado. Una señal similar se observó al hacer la hibridación con la sonda STE3 y bajo las mismas condiciones, pero con DNA sometido a una digestión doble (Figura 7B), razón por la que tampoco fue posible clonar algo a partir de este tipo de ensayos.

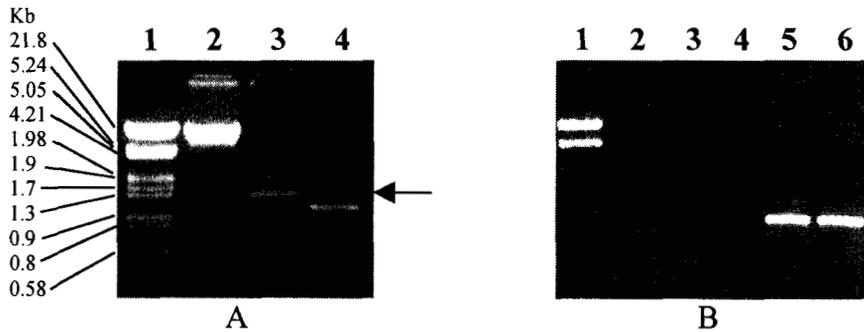


Figura 6.- A) Electroforesis de los fragmentos de restricción del plásmido pTZ18R/STE2: Carril 1= marcadores de peso molecular (*N*EcoRI-*H*indIII), carril 2= plásmido sin cortar, carril 3= fragmento del plásmido cortado con las enzimas *N*coI-*A*sp718 y purificado (corresponde al gen STE2 de *S. cerevisiae* que fue usado como sonda; está indicado con una flecha) y carril 4= fragmento del plásmido cortado con *H*paI-*S*alI y purificado (fragmento de 1084pb de STE2). B) Fragmentos de 825pb del gen STE3 de *S. cerevisiae* obtenidos por PCR. Carril 1= igual que en A, carriles 2 a 6 = productos de PCR obtenidos con concentraciones de 1mM, 2mM, 4mM y 8mM de MgCl₂ respectivamente.

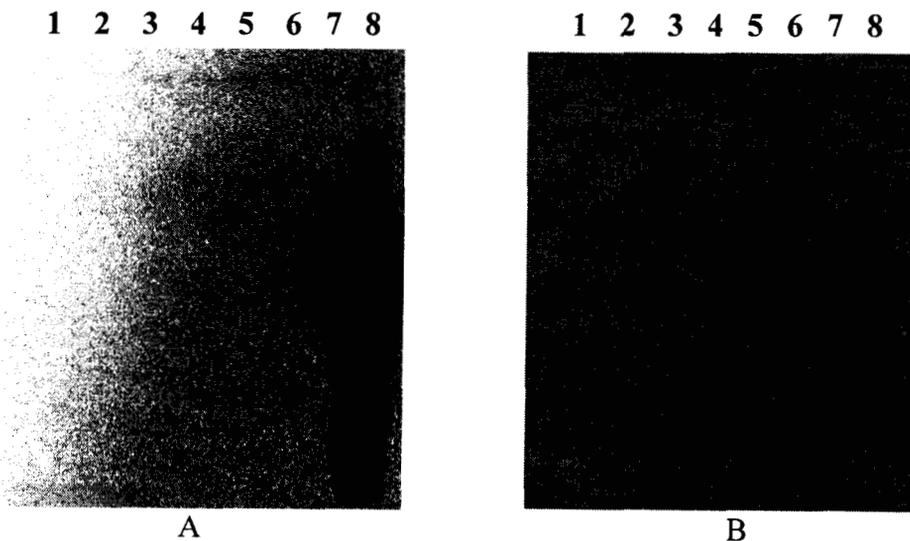


Figura 7.- A) Southern Blot con la sonda STE2. Carriles 2 a 7 = DNA genómico de *K. lactis* digerido con *E*co RI, *H*ind III, *B*am HI, *K*pn I, *P*st I y *X*ba I, respectivamente; carril 8= STE2 no marcado (control positivo). B) Southern Blot con la sonda STE3. Todos los carriles son como en A pero con la diferencia de que la digestión se hizo con *E*co RI además de la enzima utilizada en A (digestión doble).

La escasa o muchas veces nula hibridación de las sondas utilizadas en los ensayos de Southern Blot puede deberse a una muy baja homología entre los genes de los receptores para feromona de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*, a pesar de la cercanía de estos dos organismos y sus similitudes en los mecanismos de apareamiento y determinación del tipo sexual. Lo anterior concuerda con el hecho de que, no obstante sus semejanzas estructurales y funcionales, los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (conocidos como GPCRs por sus siglas en inglés) son moléculas sin homología en sus secuencias (al menos entre las diferentes familias en las que están agrupados) (39). En otras palabras, estos receptores son un ejemplo importante de convergencia molecular y, por lo tanto, lo más probable es que la homología entre los receptores de *S. cerevisiae* y los de *K. lactis* no sea lo suficientemente alta como para poder identificarlos por medio de ensayos de hibridación.

Debido a la baja señal de hibridación de las sondas de los receptores para feromonas en los ensayos ya descritos, se intentó la construcción de una biblioteca genómica de *K. lactis* WM27 (ver metodología) para hacer ensayos de hibridación con ella. Esta biblioteca se construiría en el plásmido pEG202 con la intención de utilizarla tanto en ensayos de hibridación, como en ensayos de doble híbrido (Apéndice I) en los que pudieran identificarse los genes de los receptores para feromonas por su interacción con la subunidad $G\alpha$ de la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*. Puesto que no fue posible conseguir una buena eficiencia en la transformación de *E. coli* DH5 α con los fragmentos de DNA de *K. lactis* ligados al vector pEG202, alternativamente se intentó construir una biblioteca de cDNA de la misma cepa (ver metodología). Esta biblioteca estaría construida en el vector pJG4-5, de manera que tendría la misma utilidad que la biblioteca genómica (su utilización en ensayos de doble híbrido) pero con la ventaja de poseer moléculas de cDNA; sin embargo, la eficiencia de obtención de cDNA fue muy baja y los intentos por construir esas bibliotecas fueron abandonados cuando se obtuvo una biblioteca genómica construida en el vector pSK1 (donada por el doctor H. Fukuhara) (Figura 8).

Dado que los ensayos de Southern Blot indican que la homología entre los receptores para feromona puede ser muy baja, los ensayos de hibridación se suspendieron y la biblioteca construida en pSK1 se utilizó para transformar células mutantes en la subunidad β de la proteína G de *S. cerevisiae* (Apéndice II). Con esta estrategia, el objetivo era identificar genes de *K. lactis* que revirtieran el fenotipo estéril característico de esas mutantes y que por lo tanto fueran componentes de la vía de respuesta a feromonas en esta levadura.

Las células obtenidas de las transformaciones se seleccionaron en SD sin leucina ni uracilo porque la mutante en $G\beta$ es protótrofa para leucina y el marcador presente en la biblioteca construida en pSK1 es *URA3* (Apéndice II y Figura 8, respectivamente). Luego se llevó a cabo un ensayo de apareamiento de las colonias con la cepa 70 de *S. cerevisiae* para identificar clonas que hubieran revertido el fenotipo estéril y, las colonias de células haploides que aparentemente revirtieron (se aparearon), se sembraron en parches y con ellos se repitió el ensayo de apareamiento (de esta manera es más fácil identificar un resultado positivo en ese ensayo). El resultado de este último ensayo reveló que no hubo reversión del fenotipo estéril en ninguna de las transformantes obtenidas.

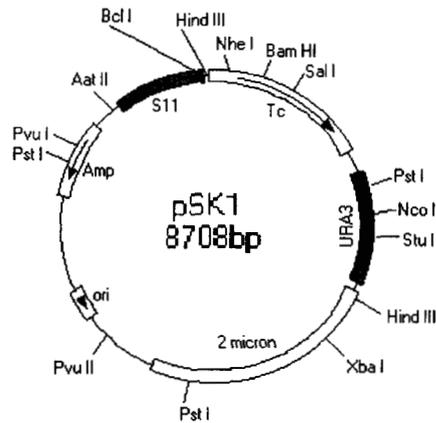


Figura 8.- Mapa del plásmido pSK1. En el sitio *Bam* HI de este plásmido está construida la biblioteca genómica de *K. lactis*.

Simultáneamente al desarrollo de las diferentes estrategias presentadas hasta ahora, que tenían como fin la identificación de genes de *K. lactis* por homología con genes de *S. cerevisiae*, se estaban llevando a cabo ensayos de despliegue diferencial cuyos resultados preliminares prometían llevar más rápidamente a la identificación de genes que se expresan diferencialmente en los dos tipos sexuales de *K. lactis* y que, por lo tanto, están involucrados en la determinación de sus distintos fenotipos; motivo por el que se decidió continuar con esta última estrategia y posponer las demás.

Despliegue diferencial

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de este proyecto es identificar genes con expresión diferencial en los dos tipos sexuales de *K. lactis*. Para ello se llevaron a cabo ensayos de despliegue diferencial (ver metodología), en los que la estrategia general consiste en amplificar por PCR secuencias parciales de cDNA (que se obtienen a partir de grupos de moléculas de mRNA de cada cepa por medio de transcripción inversa), para luego someter esas secuencias, las de una cepa al lado de las de la otra, a electroforesis. Al final, los genes que se expresan diferencialmente se identifican como bandas que aparecen en el carril que corresponde al cDNA de una de las cepas y no en el adyacente, que corresponde al de la otra cepa (35).

A través de uno de estos ensayos se identificaron varias bandas con aparente expresión diferencial, de las cuales se seleccionaron 4 para un análisis posterior (Figura 9). Las 4 bandas se seleccionaron porque además de expresarse en un solo tipo sexual, no aparecen en ningún otro carril del gel de electroforesis y son de un tamaño apropiado para su clonación y secuenciación. Una de las 4 bandas se expresa solamente en el tipo sexual α (cepa WM37) y las otras tres sólo en el tipo sexual α (cepa WM27).

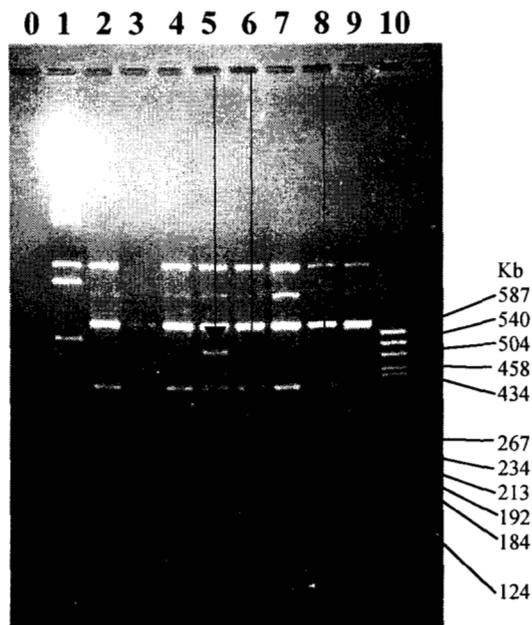


Figura 9.- Resultado del ensayo de despliegue diferencial en el que se usó el decámero AP-1. Carril 1= marcadores de peso molecular (*N/Eco* RI-*Hind* III), carriles pares = cDNA de WM27, carriles noes = cDNA de WM37; carriles 2 y 3 = T12MA, carriles 4 y 5 = T12MG, carriles 6 y 7 = T12MT, carriles 8 y 9 = T12MC (ver metodología). Las flechas indican las bandas con aparente expresión diferencial que se escogieron para un análisis posterior. Carril 10 = marcadores de peso molecular (pBR322/*Hae* III)

Los cuatro fragmentos identificados en el ensayo se purificaron y reamplificaron utilizando los oligonucleótidos con los que respectivamente se obtuvieron en la amplificación original y bajo las mismas condiciones, con excepción del número de ciclos que en esta ocasión fue mayor (ver metodología). En la Figura 10A se puede observar que se obtuvieron no una sino varias bandas en cada caso; sin embargo, puesto que las bandas de mayor tamaño correspondían a los tamaños de los fragmentos identificados originalmente, se decidió purificar del gel de agarosa a esas bandas, asumiendo que el resto de las bandas eran productos más pequeños del mismo fragmento que se produjeron por hibridación de los decámeros en sitios internos de la banda original (esto quizá sucedió por hibridación inespecífica de los oligonucleótidos dentro de cada fragmento como consecuencia de un exceso de éstos en la reacción y/o por aumentar 20 ciclos a ésta). Las bandas purificadas fueron entonces clonadas en el vector comercial pCRTMII (vector adaptado para clonación de productos de PCR amplificados con Taq polimerasa), transformando células de *E. coli* DH5a y seleccionando las transformantes con ampicilina y el sistema IPTG/X-GAL. Para la primera banda (carril 5 en la figura 9) se obtuvieron 151 transformantes positivas, para la segunda (carril 6 y flecha de arriba en figura 9) 172, para la tercera (carril 6 y flecha de abajo en figura 9) 54 y para la cuarta banda (carril 8 en figura 9) 224. Finalmente y después de revisar algunas transformantes de cada caso para verificar la presencia de los insertos, se decidió conservar a las clonas denominadas 1a, 2a, 3a y 4a, que contienen respectivamente a los plásmidos con los insertos en el orden mencionado en este mismo párrafo. La figura 10B muestra la presencia de las diferentes bandas (o insertos) en las 4 diferentes clonas.

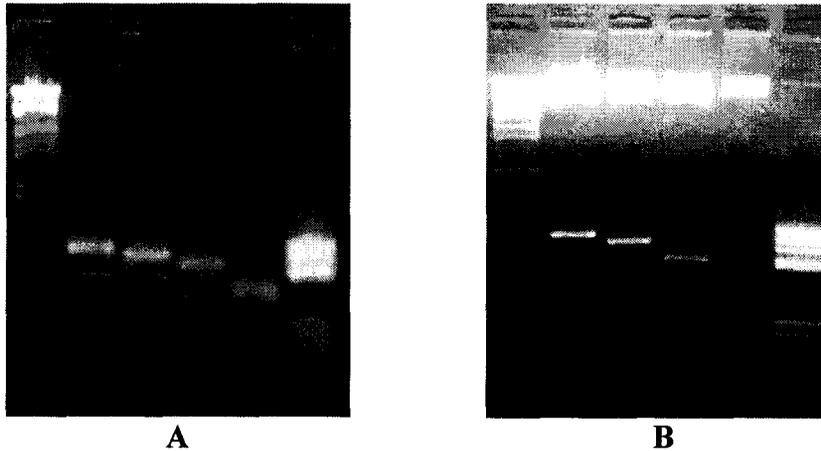


Figura 10.- A) Resultado de la reamplificación de las bandas que se identificaron en el ensayo de despliegue diferencial (el orden de las bandas es el de la figura 9 de izquierda a derecha y de arriba a abajo) (ver metodología). Las bandas más grandes fueron clonadas en el vector pCRTMII (los insertos quedan entre dos sitios de restricción *Eco*RI en este vector). B) Resultado de la digestión con *Eco*RI de los plásmidos obtenidos de las clonas 1a, 2a, 3a y 4a (en ese orden, ver texto) que muestra la presencia de cada una de las bandas clonadas. Los carriles primero y último corresponden en cada caso (A y B) a los marcadores de peso molecular λ /*Eco*RI-*Hind*III y pBR322/*Hae* III respectivamente.

Con los cuatro fragmentos clonados [que desde ahora se denominarán 1a, 2a, 3a y 4a (por provenir de las clonas homónimas)] utilizados como sondas, se llevaron a cabo ensayos de Northern Blot (Figura 11A) y Dot Blot (Figura 11B). Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de corroborar la expresión diferencial de los fragmentos en los dos tipos sexuales de *K. lactis*; sin embargo, estas técnicas no parecen ser suficientemente sensibles porque no se observó hibridación para ninguno de los tipos sexuales en ninguno de los ensayos realizados. De cualquier forma, los fragmentos clonados se secuenciaron y las secuencias de nucleótidos obtenidas (Cuadro 1), así como las secuencias de aminoácidos correspondientes, se compararon con el GeneBank. Es importante mencionar que la secuenciación de las 4 bandas reveló que éstas fueron amplificadas sólo con el iniciador AP-1 y por lo tanto no es posible saber la cercanía que tienen con el extremo 3' de los genes a los que corresponden. Esto no significa que los fragmentos no provengan de moléculas de cDNA, puesto que la generación de estas moléculas en el despliegue diferencial es prerequisite para la amplificación posterior con Taq polimerasa.

Como resultado de las comparaciones con el GeneBank, se observó que los fragmentos 1a (524pb), 3a (460pb) y 4a (348pb) no presentan homología importante con algún gen en particular, lo que sugiere que sus secuencias pueden corresponder a genes nuevos; a diferencia de lo observado para el fragmento 2a (499pb), una de cuyas secuencias de aminoácidos [la que corresponde al marco de lectura e (166 aminoácidos)] tiene una identidad de hasta 70.3% (en 165 aminoácidos) con quimiorreceptores de bacterias (Cuadro 2). Este porcentaje de identidad de 2a con proteínas de membrana sugiere que su secuencia puede corresponder a la de uno de los genes de los receptores para feromona y, por lo tanto, se decidió usar al fragmento 2a como sonda en ensayos de Southern Blot en los que se usó

DNA genómico de *K. lactis*, para así poder encontrar y clonar el gen completo correspondiente. Los resultados de esos ensayos se presentan en la figura 12, en donde es posible notar que la digestión con los pares de enzimas *EcoRI-PstI* y *EcoRI-XbaI* generan en cada caso una sola banda que hibrida con la sonda.

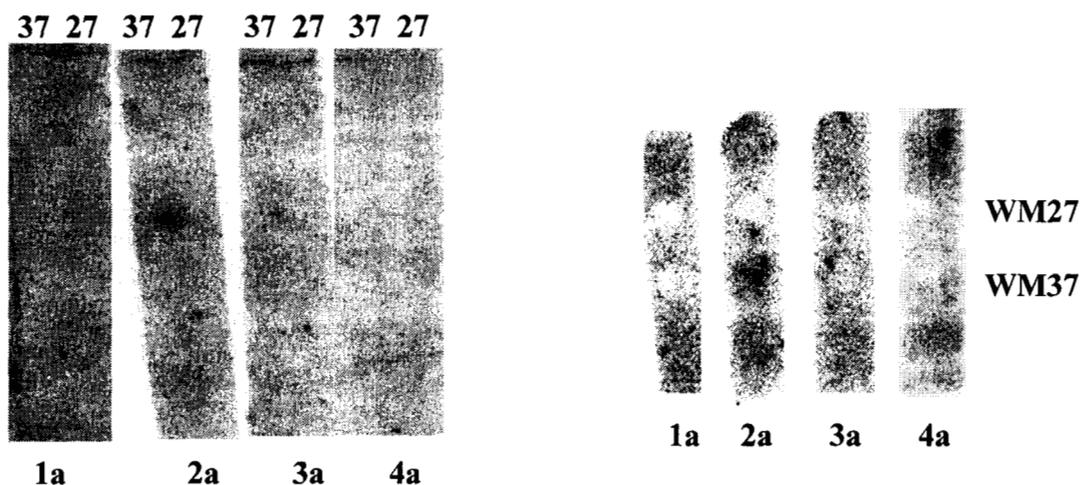


Figura 11.- Northern Blot (A) y Dot Blot (B) de RNA total de *K. lactis* WM27 y WM37 utilizando como sondas a los fragmentos 1a, 2a, 3a y 4a que fueron clonados como consecuencia del ensayo de despliegue diferencial que se muestra en la figura 9.

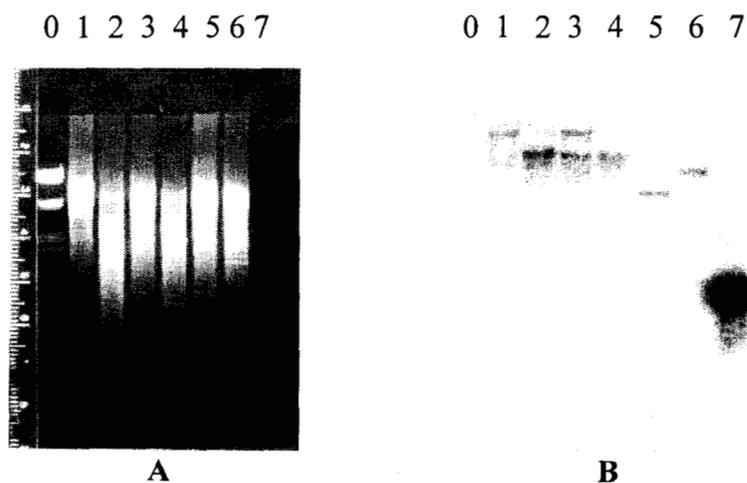


Figura 12.- A) Electroforesis de DNA de *K. lactis* WM37 digerido con *EcoRI* (1), *EcoRI-HindIII* (2), *EcoRI-BamHI* (3), *EcoRI-KpnI* (4), *EcoRI-PstI* (5) y *EcoRI-XbaI* (6). 0= λ *EcoRI-HindIII* y 7= 2a (control positivo). B) Southern Blot a partir del gel mostrado en A y utilizando 2a como sonda. En los carriles 5 y 6 están las bandas a las que se hace referencia en el texto.

LOCUS	STYTCPCHEM	1840 bp	DNA	BCT	04-MAR-1993		
DEFINITION	Salmonella typhimurium chemoreceptor (tcp) gene, complete cds.						
ACCESSION	L06029						
NID	g154380						
KEYWORDS	chemoreceptor.						
SOURCE	Salmonella typhimurium (strain LT2) DNA. . . .						
SCORES (2) Init1: 687 Initn: 687 Opt: 698 z-score: 1260.6 E(): 0							
70.3% identity in 165 aa overlap							
2apepe.pep				10	20	30	
				ASEGGTVMRQVVD	TMGDINTSSNKIADITA		
				: : : : :	: : : :		
STYTCPCHEM	ASMEQLTATVTRQNTD	NARQATGLAKTASET	ARKGGRVVDNVVST	MNDIAESSEKIVDITS			
	350	360	370	380	390	400	
2apepe.pep		40	50	60	70	80	90
		VINSIAFQTNILALNA	AVEAARAGEQGRGFA	VAVAGEVRSLSQRSS	QAARDIEQLINESVS		
		: : : : : : :	: : : : : : :	: : : : : : :	: : : : : : :		
STYTCPCHEM	VIDGIAFQTNILALNA	AVEAARAGEQGRGFA	VAVAGEVRTLASRSA	QAAKEIKVLIENSVS			
	410	420	430	440	450	460	
2apepe.pep		100	110	120	130	140	150
		RINIGSKLVVKAGET	MDQVQSVTRVNDIM	GEISSASEEQSRGIE	QIARAVGELDSTTQQ		
		: : : :	: : : : : : :	: : : : : : :	: : : : : : :		
STYTCPCHEM	RIDTGSTQVREAGET	MKEIVNAVTRVTDI	MGEIASASDEQSKG	IEQVAQAVSEMDSVT	TQQ		
	470	480	490	500	510	520	
2apepe.pep		160					
		NASLVSESSSAAGSLA					
		: : : :					
STYTCPCHEM	NASLVEESAAAAALED	QANELRQAVAAFRIQ	KQPRREASPTTLSK	GLTPQPAAEQANWE			
	530	540	550	560	570	580	

Cuadro 2.- En este cuadro se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura e del fragmento 2a (2apepe.pep), con la parte de la secuencia del gen TCP (gen del quimiorreceptor para citrato) de *Salmonella typhimurium* (STYTCPCHEM) con la que tiene una identidad de 70.3%. | = aminoácidos iguales y : = aminoácidos equivalentes.

Las regiones correspondientes a las dos bandas identificadas se purificaron y se comprobó la hibridación del DNA con la sonda 2a por medio de un ensayo de Southern Blot (Figura 13).

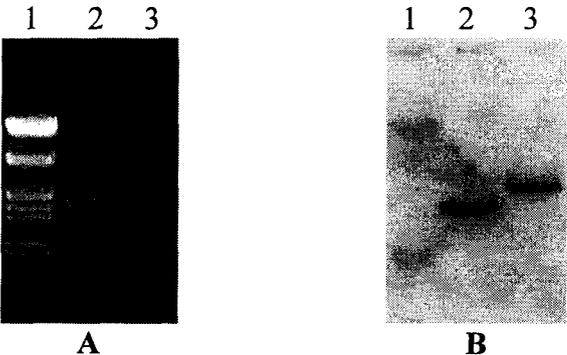


Figura 13.- A) Electroforesis de DNA de *K. lactis* WM37 que fue purificado de las regiones en donde se da la hibridación con 2a en la figura 12. El DNA proviene de una electroforesis de nuevas digestiones con *EcoRI-PstI* (2) y *EcoRI-XbaI* (3). 1 = λ *EcoRI-Hind III*. B) Southern Blot del DNA mostrado en A, utilizando 2a como sonda.

Una vez que se confirmó que el DNA purificado sí correspondía al que hibridó con la sonda 2a, se procedió a la clonación de éste en el vector pBluescript, utilizando los sitios *EcoRI-PstI* y *EcoRI-XbaI* según correspondiera y transformando células de *E. coli* DH5a. Como resultado de los ensayos de transformación se obtuvieron 60 colonias que se sembraron en parches en una caja de LB-ampicilina, para luego ser hibridados con la sonda 2a en un ensayo de hibridación en colonias (ver metodología). El resultado de este ensayo se muestra en la figura 14, en donde se observa una señal clara de hibridación en el sitio que corresponde a uno de los parches sembrados (parche o clona 33).

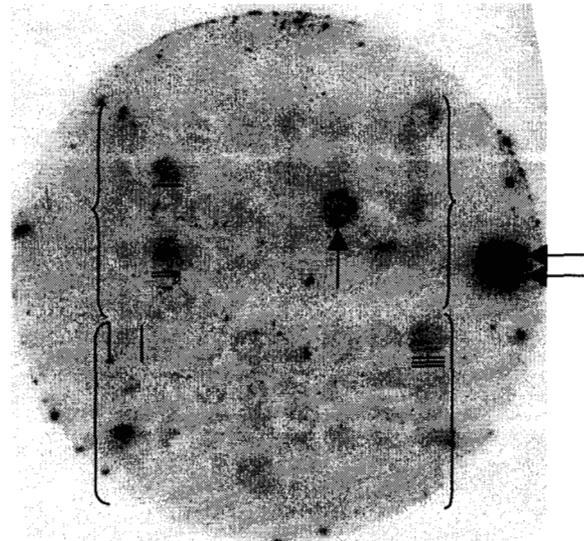


Figura 14.- Hibridación de 35 clonas con insertos *EcoRI-PstI* (llaves) y 25 clonas con insertos *EcoRI-XbaI* (paréntesis) con la sonda 2a. La flecha indica la señal de hibridación de la clona 33 y la doble flecha el control positivo (fragmento 2a no marcado). Otras clonas que presentaron hibridación tenue: 19 (subrayado), 40 (doble subrayado) y 70 (triple subrayado). Clonas negativas seleccionadas como control: 63 (entre barras) y 44 (abajo de 33).

Tanto la clona 33 como las clonas 19, 40 y 70 (todas hibridaron en mayor o menor grado con 2a) se resembraron para ser analizadas posteriormente y también se resembraron las clonas 63 y 44 (clonas que no hibridaron) para usarse como controles negativos.

El inserto de la clona 33 se secuenció y su secuencia de nucleótidos (2052pb que no incluyen la secuencia de 2a) y de aminoácidos se compararon con el GeneBank. El análisis reveló que el marco de lectura c (nucleótido 1 al 1769 del inserto en dirección *EcoRI* a *PstI*) tiene identidad de 73.7% con el gen TOR1 de *S. cerevisiae* en 1769 nucleótidos (Cuadro 3) y de 72.9% con el gen TOR2 de esa misma levadura en 1770 nucleótidos (Cuadro 4). La secuencia de aminoácidos correspondiente a ese marco de lectura (589 aminoácidos) presenta por su parte una identidad de 83.5% con el producto del gen TOR1 de *S. cerevisiae* en 588 aminoácidos (Cuadro 5) y de 82.9% con el producto del gen TOR2 de esa misma levadura, en 589 aminoácidos (Cuadro 6). Estos resultados indican que la secuencia encontrada pertenece a uno de los genes TOR de *K. lactis*.

LOCUS	SCTOR1	7974 bp	DNA	PLN	29-MAR-1994					
DEFINITION	S.cerevisiae TOR1 gene.									
ACCESSION	X74857									
NID	g468738									
KEYWORDS	TOR1 gene.									
SOURCE	baker's yeast. . . .									
SCORES	Init1:	4558	Initn:	4558	Opt:	4651	z-score:	4581.8	E():	0
	73.7% identity in 1769 bp overlap									
inserto2a33.				10	20	30				
				GAATTCATCAACCAATCAAACCGTTAGTA						
SCTOR1	GGCTTGAAGTCTTACCACAGTTGATCTCTCGTATACATCAGCCAGATCCTACGGTGAGTA									
	5920	5930	5940	5950	5960	5970				
inserto2a33.	40	50	60	70	80	90				
	GATCTTACTATCTTTGCTAGCTGATTTGGGTAAAGCCCATCCACAGGCATTAGTGTATC									
SCTOR1	ATTCCCTTTTGTGCTTCTGATTTAGGGAAAGCTCATCCACAAGCTCTCGTGTATC									
	5980	5990	6000	6010	6020	6030				
inserto2a33.	100	110	120	130	140	150				
	CATTGACAGTTGCCATTAATCTGATTCGGTCTCAAGACAGAGGGCAGCTTTGTCCATCA									
SCTOR1	CTTTAAGTGTGCGATCAAGTCTGAATCTGTTCAAGACAAAAGCGGCTCTTCAATAA									
	6040	6050	6060	6070	6080	6090				
inserto2a33.	160	170	180	190	200	210				
	TAGATAAGATGAGAATGCACAGTCCCTAACTTGTCGATCAAGCAGAATTAGTAAGTGACG									
SCTOR1	TAGAGAAAATTAGGATTCATAGTCCAGTCCGGTAAACCAGGCAGAATTAGTTAGTCAGC									
	6100	6110	6120	6130	6140	6150				
inserto2a33.	220	230	240	250	260	270				
	AATTGATCAGAGTCGCTGTTTTGTGGCAGCAACTTTGGTACGAAGGCTTGAAGATGCTA									
SCTOR1	AGTTGATCAGAGTAGCCGTTCTATGGCAGCAATTATGGTATGAAGGACTGGAAGATGCGA									
	6160	6170	6180	6190	6200	6210				
inserto2a33.	280	290	300	310	320	330				
	GTAGACAATCTTTGGTGAACATAACACGGAAAAGATGTTTGGCACTTTGGAGCCATTGC									
SCTOR1	GCCGCCAATTTTTCGTTGAACATAACATAGAAAAATGTTTCTACTTTAGAACCTTTAC									
	6220	6230	6240	6250	6260	6270				
inserto2a33.	340	350	360	370	380	390				
	ATGAGATGCTAAAACGTTGGTCTGAAACCTTGCGTGAGATTCGTTCCAAAATTCGTTTG									
SCTOR1	ATAAACACTTAGGCAATGAGCCTCAAACGTTAAGTGAGGTATCGTTTCAGAAATCATTTG									
	6280	6290	6300	6310	6320	6330				
inserto2a33.	400	410	420	430	440	450				
	GTAGGGATTTGAACGATGCCACAGTGGGTAATGAACACTACAAGAGAACAAAAGATATCA									
SCTOR1	GTAGAGATTTGAACGATGCCTACGAATGGTTGAATAACTACAAAAGTCAAAGACATCA									
	6340	6350	6360	6370	6380	6390				
inserto2a33.	460	470	480	490	500	510				
	ACAACCTTAACCAAGCTTGGGATATCTATTATAATGTCTTCCGTCGTATTAGCAGGAAAC									
SCTOR1	ATAATTTGAACCAAGCTTGGGATATTATTATAACGTTTCAGAAAAATAACAGTCAA									
	6400	6410	6420	6430	6440	6450				

Cuadro 3.- Comparación de la secuencia de nucleótidos del inserto de la clona 33, desde el nucleótido 1 hasta el 1769 (inserto 2a33), con la secuencia de la región del gen TOR1 de *S. cerevisiae* (SCTOR1) con la que tiene identidad de 73.7%. | = nucleótidos iguales.

	1180	1190	1200	1210	1220	1230
inserto2a33.	GTTTAGGTGATCGTCATCCAAGTAATTTGATGTTGGACCGTGTACTGGTAAAGTTGTCC					
SCTOR1						
	GACTAGGTGATCGCCATCCAAGCAACCTGATGCTAGATAGAATCACCGGTAAAGTTATCC					
	7120	7130	7140	7150	7160	7170
	1240	1250	1260	1270	1280	1290
inserto2a33.	ACATTGATTTCCGGTACTGTTTGAAGCTGCAATTCTCAGAGAGAAATACCCAGAAAAGG					
SCTOR1						
	ACATTGATTTCCGGCATTGTTTGAAGCTGCCATCTTAAGAGAAAAGTATCCAGAAAAG					
	7180	7190	7200	7210	7220	7230
	1300	1310	1320	1330	1340	1350
inserto2a33.	TACCATTAGATTAACAAGAATGTTAACGTACGCAATGGAAGTCAGTGGTATTGAAGGTA					
SCTOR1						
	TGCCATTTAGACTAACTAGGATGTTAACATACGCAATGGAAGTAGTGAATTGAAGGCA					
	7240	7250	7260	7270	7280	7290
	1360	1370	1380	1390	1400	1410
inserto2a33.	GTTTCCGTATCACCTGTGAGAACGTAATGATGGTCCCTAAGGGATAATAAGGAGTCCCTGA					
SCTOR1						
	GTTTCCGAATTACTTGTGAAAATGTCATGAGAGTCTTAAGAGATAATAAAGAATCATTAA					
	7300	7310	7320	7330	7340	7350
	1420	1430	1440	1450	1460	1470
inserto2a33.	TGGCTATTTTGAAGCCTTTGCATACGATCCATTAATCAACTGGGGTTTCGATCTACCGA					
SCTOR1						
	TGGCGATCTTGAAGCCTTTGCGCTTGATCCTTTGATCCATTGGGGATTTCGATTTACCGC					
	7360	7370	7380	7390	7400	7410
	1480	1490	1500	1510	1520	1530
inserto2a33.	CTCAAGCCGTGATGGAACAGACGGGAATAGATCTACCTCTTGCAAAATCCAAGTGAATTAC					
SCTOR1						
	CACAAAACTTACTGAGCAAACTGGAATTCCTTTGCCGTTGATTAATCCTAGTGAATTAT					
	7420	7430	7440	7450	7460	7470
	1540	1550	1560	1570	1580	1590
inserto2a33.	TAAGAAAGGGCGTCATCACCGTTGAAGATGCGGCCAAGATGGAACACAAAAGGCAG					
SCTOR1						
	TAAGAAAGGGCGCAATTACTGTGGAAGCGGCAAAATATGGAAGCAGAACAAAATG					
	7480	7490	7500	7510	7520	7530
	1600	1610	1620	1630	1640	1650
inserto2a33.	AAGTCCGCAACGCAAGAGCCACTCTTGTCTCAAAGAATCGCTGATAAACTTACTGGTA					
SCTOR1						
	AGACCAGAAACGCCAGAGCAATGCTTGTGAGACGTATTACAGATAAATTAACGGGCA					
	7540	7550	7560	7570	7580	7590
	1660	1670	1680	1690	1700	1710
inserto2a33.	ACGATTTCCCAAGGTATCAAGAACTATCTGTGCCTGATCAAGTCGACAAGTTGATCCAGC					
SCTOR1						
	ATGATATCAAGAGGTTCAATGAATTAGACGTCCTGAGCAGGTTGATAAACTGATCCAAC					
	7600	7610	7620	7630	7640	7650
	1720	1730	1740	1750	1760	1769
inserto2a33.	AAGCTACATCAGTAGAAAACCTATGTCAACATTACATCGGCTGGTGTTCGTTCTGGTGA					
SCTOR1						
	AAGCCACTTCTATTGAAAGGTTATGTCAACATTATATTGGATGGTGCCATTCTGGTGAC					
	7660	7670	7680	7690	7700	7710
SCTOR1	TGCGGTGTCATTTTTCATTTTCGTGCTTTGTTTACTATTTATTTTTTTTGTATTACGCATT					
	7720	7730	7740	7750	7760	7770

Cuadro 3.- Fin del cuadro.


```

LOCUS      SCTOR1      7974 bp      DNA      PLN      29-MAR-1994
DEFINITION S.cerevisiae TOR1 gene.
ACCESSION  X74857
NID        g468738
KEYWORDS   TOR1 gene.
SOURCE     baker's yeast. . . .

SCORES (2) Init1: 3353 Initn: 3353 Opt: 3353 z-score: 5486.8 E(): 0
83.5% identity in 588 aa overlap

inserto2a33c              10      20      30
                          IHQPNQTVSRSLLSLLADLGKAHPQALVYP
                          ||||: ||| |||||:|||||||
SCTOR1      IKEVSQAMYEGFNLMKIENWLEVLPLQLISRHHQPDPTVSNLSLSDLGKAHPQALVYP
              1960      1970      1980      1990      2000      2010

inserto2a33c      40      50      60      70      80      90
LTVAIKSDSVSRQRAALSII DKMRMHSPKLVDAQELVSDDELIRVAVLWHELWYEGLEDAS
|||||:||||:||||:|:| ||| ||:||||| |||||
SCTOR1      LTVAIKSESVSRQKAALSIEKIRIHSPVLVNQAEVLSHELIRVAVLWHELWYEGLEDAS
              2020      2030      2040      2050      2060      2070

inserto2a33c      100     110     120     130     140     150
RQFFGEHNTEKMFATLEPLHEMLKRGPETLREISFQNSFGRDLNDAHEWVMNYKRTKDIN
||| ||| |||:||||:| |:| | |:|:| |||||:|:| |||:| |||
SCTOR1      RQFFVEHNIEKMFSTLEPLHKHLGNEPQTLSEVVSFQKSFGRDLNDAHEWVMNYKKSKDIN
              2080     2090     2100     2110     2120     2130

inserto2a33c      160     170     180     190     200     210
NLNQAWDIYYNVFRIRSRKLPQLQTLDLQHVSPKLAALKLELAVPGTYHAGKPVIRITH
|||||:||||:|:| ||| |||||:| |:| ||||| |||:| |||:
SCTOR1      NLNQAWDIYYNVFRKITRQIPQLQTLDLQHVSPQLLATHDELAVPGTYFPGKPTIRIAK
              2140     2150     2160     2170     2180     2190

inserto2a33c      220     230     240     250     260     270
FEPIFTVISSKQRPRLRSIKGSDGKDYQYIVKGHEDIRQDNLVMQLFGLVNTLLQNNPES
|||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |
SCTOR1      FEPLFSVISSKQRPKFSIKGSDGKDYKYLKGHEDIRQDSLVMQLFGLVNTLLKNDSEC
              2200     2210     2220     2230     2240     2250

inserto2a33c      280     290     300     310     320     330
FQRHLNIQQYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTFHVLIREHREASKVPLNIEHRIMLQMAPDY
|:|:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||
SCTOR1      FKRHLDIQQYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTFHVLIREHRDAKKIPLNIEHWVMLQMAPDY
              2260     2270     2280     2290     2300     2310

inserto2a33c      340     350     360     370     380     390
DNLTLLQKVEVFTYALDNTKGQDLYKVLWLKSRSSSESWLERRTTYTRSLAVMSMVGYILG
:|:|:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||
SCTOR1      ENLTLLQKIEVFTYALDNTKGQDLYKILWLKSRSSSETWLERRTTYTRSLAVMSMTGYILG
              2320     2330     2340     2350     2360     2370

inserto2a33c      400     410     420     430     440     450
LGDRHPSNMLDRVTGKVVHIDFGDCFEAAILREKYPEKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGS
|||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||
SCTOR1      LGDRHPSNMLDRITGKVIHIDFGDCFEAAILREKYPEKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGS
              2380     2390     2400     2410     2420     2430

inserto2a33c      460     470     480     490     500     510
FRITCENVMVLRDNKESLMAILEAFAYDPLINWGFDPQTQAVMEQTGIDLPLANPSELL
|||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||:|:| |||||
SCTOR1      FRITCENVMRVLDRDNKESLMAILEAFALDPLIHWFDPQLTEQGTGIPPLINPSELL
              2440     2450     2460     2470     2480     2490

```

Cuadro 5.- Comparación de la secuencia de aminoácidos que corresponde al marco de lectura c del inserto de la clona 33 (inserto 2a33c) con la secuencia de aminoácidos de la región del gen TOR1 de *S. cerevisiae* (SCTOR1) con la que tiene identidad de 83.5%. | = aminoácidos idénticos, : = aminoácidos equivalentes.

	520	530	540	550	560	570
inserto2a33c	RKGVITVEDAAKME	LQKAEVNRARATL	VLKKRIADKLTGND	FPRYQELSVDPDQ	VDKLIQQ	
	: : : :	: : :	: : :	: : : : :		
SCTOR1	RKGAITVEEAANME	AEQONETRNRAML	VLRITDKLTGNDIK	RFNELDVPEQVDK	LIIQQ	
	2500	2510	2520	2530	2540	2550
	580	589				
inserto2a33c	ATSVENLCQHYIGW	CSEFWX				
	:					
SCTOR1	ATSIERLCQHYIGW	CFWXLRCHF	SFRALFTIYFFC	ITHLYTCASIVY	YYYYYYYHYFCNI	
	2560	2570	2580	2590	2600	2610

Cuadro 5.- Fin del cuadro.

LOCUS	SCTOR2	7800 bp	DNA	PLN	14-MAY-1993					
DEFINITION	S.cerevisiae gene TOR2.									
ACCESSION	X71416									
NID	g298027									
KEYWORDS	cell cycle-related protein; rapamycin; signal transduction protein; TOR2 gene. . . .									
SCORES	(3) Init1:	2209	Initn:	3338	Opt:	3340	z-score:	5465.6	E():	0
	82.9% identity in 589 aa overlap									
				10	20	30				
inserto2a33c				IHQPNQTVSR	SLLSLLADL	GKAHPQALVYP				
SCTOR2	IPEATQAMHEGFN	LIQIGTWLEVL	PQLISR	IHQPNQIVSR	SLLSLLSDL	GKAHPQALVYP				
	1940	1950	1960	1970	1980	1990				
	40	50	60	70	80	90				
inserto2a33c	LTVAIKSDSVSR	QRAALSII	DKMRMHS	PKLVDAQELV	SDELIRVAVL	WHELWYEGLEDAS				
			: : :							
SCTOR2	LMVAIKSESLSR	QKAALSII	EKMRIHSP	VLDQAELV	SHELIRMAVL	WHEQWYEGLDAS				
	2000	2010	2020	2030	2040	2050				
	100	110	120	130	140	150				
inserto2a33c	RQFFGEHNTEK	MFATLEPLHE	MLKRGPE	TREISFQNS	FGRDLNDA	HEWVMNYKRTKDIN				
SCTOR2	RQFFGEHNTEK	MFAALEPLY	EMLKRGPE	TREISFQNS	FGRDLNDA	YEWLMNYKKS	KDVS			
	2060	2070	2080	2090	2100	2110				
	160	170	180	190	200	209				
inserto2a33c	NLNQAWDIY	YVFRRI	SRKLPQL	QTLDLQHV	SPKLA	AKDLELAVPGTY-HAGKPVIRIT				
SCTOR2	NLNQAWDIY	YVFRKIGK	QLPQLQ	TLELQHV	SPKLLSA	HDLELAVPGTRASGGKPIVKIS				
	2120	2130	2140	2150	2160	2170				
	210	220	230	240	250	260	269			
inserto2a33c	HFEPIFTVISS	KQRPRRLS	IKGSDGKDY	QYIVKGHED	IRQDNLV	QLFGLVNTLLQNNPE				
	: : :									
SCTOR2	KFEPVFSVISS	KQRPRKFC	IKGSDGKDY	KYVLKGHED	IRQDSL	VMLFGLVNTLLQND	AE			
	2180	2190	2200	2210	2220	2230				
	270	280	290	300	310	320	329			
inserto2a33c	SFQRHLNIQ	QYPAIPL	SPKSGLLG	WVNSDTF	HVLIREH	REASKVPLNIEHRIMLQMAPD				
SCTOR2	CFRRHLDIQ	QYPAIPL	SPKSGLLG	WVNSDTF	HVLIREH	REAKKIPLNIEHWMLQMAPD				
	2240	2250	2260	2270	2280	2290				

Cuadro 6.- Comparación de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura c del inserto de la clona 33 (inserto2a33c) con la secuencia de la región del gen TOR2 de *S. cerevisiae* (SCTOR2) con la que tiene una identidad de 82.9%. | = aminoácidos idénticos; : = aminoácidos equivalentes.

	330	340	350	360	370	380	389
inserto2a33c	YDNLTL	LQKVEV	FVTYAL	DNTRGQ	DLYKVL	WLKSRSS	ESWLERRTTY
SCTOR2	YDNLTL	LQKVEV	FVTYAL	NNTEGQ	DLYKVL	WLKSRSS	ETWLERRTTY
	2300	2310	2320	2330	2340	2350	
	390	400	410	420	430	440	449
inserto2a33c	GLGDRH	PSNMLD	RVTKGV	HIDFGDC	FEAAIL	REKYPE	KVPFRLTR
SCTOR2	GLGDRH	PSNMLD	RITGKVI	HIDFGDC	FEAAIL	REKFPE	KVPFRLTR
	2360	2370	2380	2390	2400	2410	
	450	460	470	480	490	500	509
inserto2a33c	SFRITC	ENVMMV	LRDNKES	LMAILE	AFAFDPL	INWGF	DLPTQAV
SCTOR2	SFRITC	ENVMMV	LRDNKES	LMAILE	AFAFDPL	INWGF	DLPTKKIE
	2420	2430	2440	2450	2460	2470	
	510	520	530	540	550	560	569
inserto2a33c	LRKGVIT	VEDAAK	MELQQK	AEVRNAR	ATLVLK	KRIADK	LTGNDFPR
	:	:	:	:	:	:	:
SCTOR2	LSNGAI	TEEEVQ	RVENEH	KNAIRN	ARAMLV	LKRI	TDKLTGND
	2480	2490	2500	2510	2520	2530	
	570	580	589				
inserto2a33c	QATSVEN	LCQH	YIGWCS	FWX			
SCTOR2	QATSVEN	LCQH	YIGWCF	WFXFCI	ENHLV	VVYSLX	KCKIKMHL
	2540	2550	2560	2570	2580	2590	

Cuadro 6.- Fin del cuadro.

Los productos de los genes TOR (por "target of rapamycin") son cinasas de la familia de las cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol-cinasa (cinasas relacionadas a PIK) que no tienen actividad de cinasa en lípidos y, en lugar de eso, se comportan como cinasas de serina/treonina. Son moléculas muy conservadas desde hongos hasta mamíferos y para muchos organismos (si no es que para todos) pueden funcionar como moléculas señalizadoras clave utilizadas para controlar el crecimiento en respuesta a nutrientes. Lo anterior se deduce de la observación de que en respuesta a nutrientes TOR activa el inicio de la traducción, organiza el citoesqueleto de actina (sólo en levadura, ver abajo), regula el tráfico de membranas y la degradación de proteínas, participa en la señalización por proteína cinasa C (PKC), promueve la biogénesis ribosomal y activa también la transcripción, siendo todos estos eventos la base del crecimiento celular. En otras palabras, TOR puede ser considerado como un controlador central del crecimiento celular (42).

Es importante hacer notar que *S. cerevisiae* es el único caso reportado hasta el momento en el que existen 2 genes TOR. En esta levadura, TOR2 (y no TOR1) tiene una actividad de la que depende el crecimiento polarizado característico de las levaduras gemantes. Esta actividad controla la polarización dependiente de ciclo celular del citoesqueleto de actina y no es inhibida por rapamicina (42).

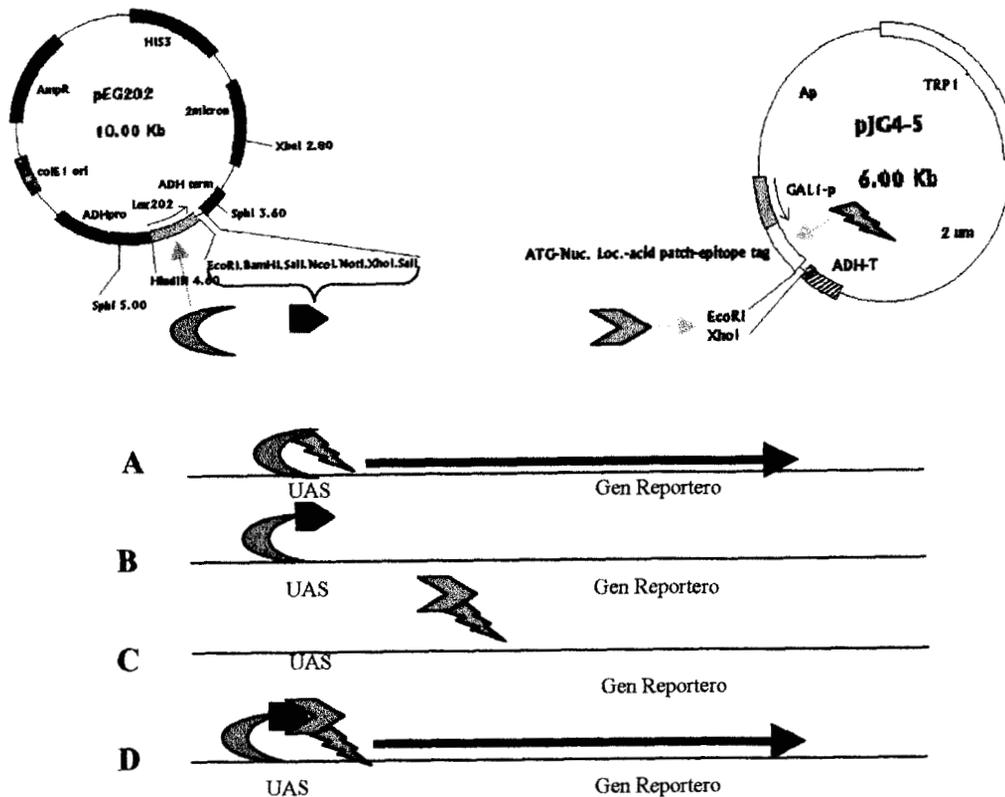
Lo anterior indica que es probable que el gen TOR de *K. lactis* no sea un gen con expresión diferencial en sus dos tipos celulares haploides, pero, si lo es, la diferencia puede darse en el nivel de expresión del gen en cada tipo sexual. Evidentemente, el que TOR sea un gen con expresión diferencial o no en *K. lactis* tendrá que ser investigado. Por otro lado, aunque se ha observado que la inactivación de los genes TOR en la levadura lleva a la detención del ciclo celular en fase G1, esto no parece tener relación con la detención del

CONCLUSIONES

Los resultados de este proyecto comprenden la identificación del gen (o uno de los genes) TOR de *K. lactis*, cuya expresión todavía tiene que ser investigada para conocer si es o no diferencial. Por otro lado, en lo que a los genes con expresión diferencial se refiere, este proyecto permitió la estandarización de la técnica de despliegue diferencial en geles de agarosa y, a través de ésta, la identificación de 4 secuencias parciales (denominadas 1a, 2a, 3a y 4a) que prometen servir para la identificación de genes que se expresan diferencialmente en los dos tipos sexuales de *K. lactis*. La secuencia 2a tiene un alto porcentaje de identidad (de hasta 70.3%) con quimiorreceptores de bacterias. Además, el proyecto resultó en la generación de una mutante en la subunidad β de la proteína G de *S. cerevisiae*, que servirá en el futuro para encontrar genes de la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*, por medio de la reversión del fenotipo estéril característico de dicha mutante al transformarla con un banco de DNA genómico de *K. lactis* del que se dispone.

APENDICE I

SISTEMA DEL DOBLE HIBRIDO



El sistema del doble híbrido es un sistema que sirve para determinar si dos proteínas X y Z interactúan y se basa en el hecho de que un factor de transcripción funcional (figura naranja-verde en A) con dominios de unión a DNA (naranja) y de activación de la transcripción (verde) físicamente separables, puede ser reconstituido a través de la interacción no covalente de dos proteínas híbridas independientes que contienen, por un lado, a la proteína X (azul) fusionada al dominio de unión a DNA (naranja) y, por otro lado, a la proteína Z (rosa) fusionada al dominio de activación de la transcripción (verde). De esta manera, si las proteínas híbridas son coexpresadas en una célula y se asocian gracias a la interacción de sus proteínas fusionadas X (azul) y Z (rosa), entonces el factor de transcripción reconstituido (figura de 4 colores en D) activa la transcripción (flecha azul marino) de un gen reportero a partir de la UAS (Upstream Activating Sequence) reconocida por el dominio de unión a DNA (naranja). Lo anterior no sucede si las proteínas híbridas son expresadas solas, porque en cada caso hace falta el otro dominio del factor de transcripción (B y C) (40,41).

En la parte superior de la figura se muestran los plásmidos en los que se pretendía hacer la construcción de las bibliotecas de *K. lactis* en este trabajo y que son usados en ensayos de doble híbrido (hay variantes de este sistema que usan otros plásmidos). El plásmido pEG202 contiene el dominio de unión a DNA LexA (flecha naranja) inmediatamente antes del sitio de policlonación en donde se pretendía insertar la biblioteca (llave azul) para así generar proteínas híbridas como las que se ven en B. Por otro lado, el plásmido pJG4-5 contiene al activador de la transcripción B42 (flecha verde), al cual siguen los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* que en el presente proyecto serían utilizados para

insertar la biblioteca de cDNA (flecha rosa) y así generar proteínas híbridas como las que se ven en C. En cualquiera de los casos, la idea de tener una biblioteca construida en alguno de estos plásmidos tenía como fin encontrar genes de la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis* que interactuen con la subunidad $G\alpha$ que participa en esta vía, a través de un ensayo de doble híbrido en el que el gen de esa subunidad estaría insertado en el otro plásmido. Es importante mencionar que en el sistema se incluye además un tercer plásmido que contiene al gen reportero (para este caso el tercer plásmido sería pSH18) (41).

A P E N D I C E I I

CONSTRUCCION DE UNA MUTANTE DE *S. cerevisiae* EN LA SUBUNIDAD G β .

Como en el laboratorio no se contaba con una mutante en G β que fuera auxótrofa para el marcador presente en la biblioteca genómica (*URA3*, ver figura 8), se procedió a la construcción de esa mutante a partir de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*. Para lograrlo se extrajo un fragmento *Pst*I-*Xba*I de 948pb del gen STE4 de *S. cerevisiae* (el gen ya se tenía clonado en el vector pJG4-5), que abarca desde el nucleótido 586 hasta el 1533 de la secuencia del GeneBank con número de acceso M23982. El fragmento se subclonó en el sitio *Pst*I-*Xba*I del plásmido integrativo YIp351 (Figura A1) transformando células de *E. coli* DH5 α y seleccionando con ampicilina y el sistema IPTG/X-GAL. Una vez que por medio de una restricción *Pst*I-*Xba*I se confirmó la presencia del fragmento en el vector en 3 de las 10 clonas obtenidas en la transformación (Figura A2), el siguiente paso fue la transformación de *S. cerevisiae* W303-1A con el plásmido resultante YIp351/*Pst*I-*Xba*I-STE4, que fue cortado previamente en el sitio único *Bgl* II presente dentro del fragmento de STE4. Lo anterior se hizo con la intención de insertar, por recombinación homóloga, un cassette de *LEU2* (Figura A1) que provocara la disrupción del gen STE4 endógeno. Las mutantes obtenidas con este procedimiento se seleccionaron en medio SD que poseía todos los aminoácidos requeridos por *S. cerevisiae* W303-1A, excepto leucina. De las múltiples colonias obtenidas se seleccionaron 50 al azar y se sembraron en “parches” que más tarde fueron utilizados en ensayos de apareamiento con la pareja *S. cerevisiae* 70. Al final, sólo las clonas 6, 26, 31, 37 y 40 se conservaron por presentar un fenotipo estéril claro (Figura B). La primera de ellas fue la que se utilizó en las transformaciones que se mencionan en la sección de resultados y discusión, que tenían como objetivo lograr revertir el fenotipo estéril de la mutante en G β para así identificar componentes de la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis*.

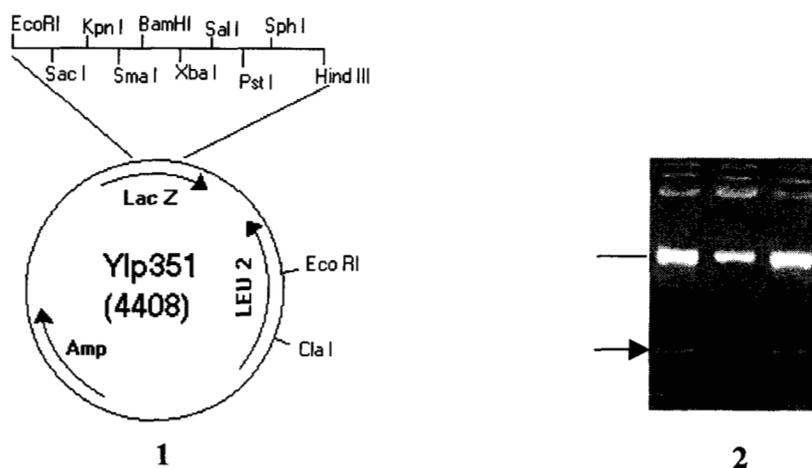


Figura A.- 1) Mapa del plásmido YIp351. En este plásmido se insertó un fragmento del gen STE4 de *S. cerevisiae* (ver texto y 2 de esta figura). 2) Fragmentos obtenidos de la digestión de YIp351/*Pst*I-*Xba*I-STE4 con *Pst*I y *Xba*I, a partir de 3 clonas que resultaron de la subclonación de un fragmento de 948pb del gen STE4 de *S. cerevisiae* (flecha) en el vector YIp351 (línea) (ver texto).

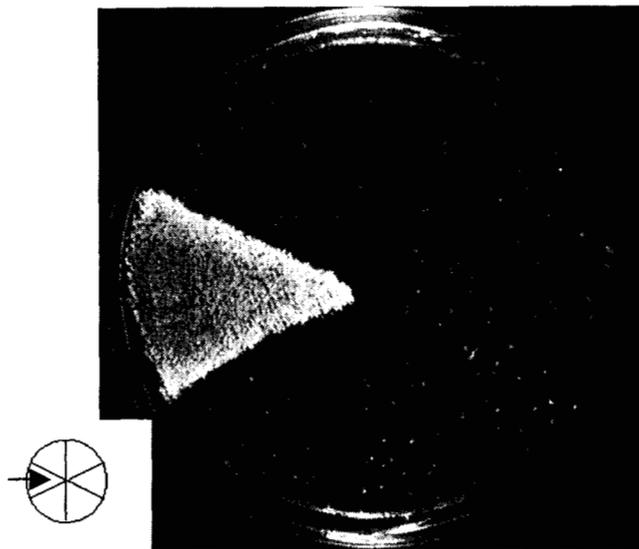


Figura B.- Resultado de un ensayo de apareamiento entre *S. cerevisiae* W303-1A (región indicada con una flecha en el pequeño esquema abajo-izquierda) y las mutanes en β (las otras cinco regiones en el esquema) con un césped de *S. cerevisiae* 70. W303-1A sirve en este ensayo como control positivo. Las mutanes en β están en el siguiente orden con respecto a W303-1A en el sentido contrario a las manecillas del reloj: 6, 26, 31, 37 y 40.

BIBLIOGRAFIA

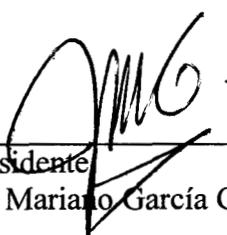
1. Herskowitz, I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342:749-757.
2. Ner, S. S. & Smith, M. (1988). Analysis of the C-terminal DNA-binding region of MATa1 gene product by *in vitro* mutagenesis using oligodeoxynucleotides with random mismatches. *Yeast* 4: G10.
3. Leberer, E., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (1997). Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 59-66.
4. Whiteway, M., Hougan, L., Thomas, D. Y., Bell, L., Saari, G. C., O'Hara, P. & MacKay, V. L. (1988). STE4 encodes the β subunit of the mating pheromone responsive G protein complex of yeast. *Yeast* 4: G13.
5. Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187-197.
6. Hirschman, J. E., De Zutter, G. S., Simonds, W. F. & Jenness, D. D. (1997). The G $\beta\gamma$ complex of the yeast pheromone response pathway – subcellular fractionation and protein-protein interactions-. *J. Biol. Chem.* 272(1): 240-8.
7. Pryciak, P. M. & Huntress, F. A. (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G $\beta\gamma$ complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev.* 12(17): 2684-97.
8. Yuan, Y. O., Stroke, I. L. & Fields, S. (1993). Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the $\alpha 1$ and STE12 proteins. *Genes Dev.* 7(8):1584-1597.
9. Madden, K. & Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:687-744.
10. Nern, A. & Arkowitz, R. A. (1999). A Cdc24p-Far1p-G $\beta\gamma$ protein complex required for yeast orientation during mating. *J. Cell Biol.* 144(6): 1187-202.
11. Butty, A. C., Pryciak, P. M., Huang, L. S., Herskowitz, I. & Peter, M. (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* 282(5393): 1511-6.
12. Ayscough, K. R. & Drubin, D. G. (1998). A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signaling. *Curr. Biol.* 8(16): 927-30.

13. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology Of The Cell*. Third Edition. Garland Publishing, Inc. New York USA. pp. 833.
14. Farley, F. W., Satterberg, B., Goldsmith, E. J. & Elion, E. A. (1999). Relative dependence of different outputs of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway on the MAP kinase Fus3p. *Genetics* 151(4): 1425-44.
15. Miyata, H., Tachibana, K. & Yanagishima, N. (1988). G1-arrest for mating reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 4: G9.
16. Kreger-van Rij, N. J. W. en - *The Yeasts* (1987). Vol. 1. Second Edition. Edited by: A. H. Rose & J. S. Harrison. Academic Press. pp. 5-55.
17. Schaffrath, R. & Breunig, K. D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Review. *Fungal Genet. Biol.* 30(3): 173-90.
18. Belloch, C., Querol, A., García, M. D. & Barrio, E. (2000). Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 405-16.
19. Keogh, R. S., Seoighe, C. & Wolfe, K. H. (1998). Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14(5): 443-57.
20. Johnston, J. R., Contopoulou, C. R. & Mortimer, R. K. (1988). Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. *Yeast* 4(3): 191-8.
21. Swinkels, B. W., van Ooyen, A. J. J. & Bonekamp, F. J. (1993). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. Review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64(2): 187-201.
22. Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K. D. & Fukuhara, H. (1996). *Kluyveromyces lactis*: genetics, biochemistry and molecular biology of non-conventional yeasts. Springer-Verlag K. G., Berlin, Germany.
23. Astrom, S. U. & Rine, J. (1998). Theme and variation among silencing proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 148(3): 1021-9.
24. Saviñon-Tejeda, A. L., Ongay-Larios, L., Valdés-Rodríguez, J. & Coria, R. (2001). The *KlGpal* gene encodes a G-protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 183(1): 229-34.
25. Ozier-Kalogeropoulos, O., Malpertuy, A., Boyer, J., Tekaiia, F. & Dujon, B. (1998). Random exploration of the *Kluyveromyces lactis* genome and comparison with that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.* 26(23): 5511-24.

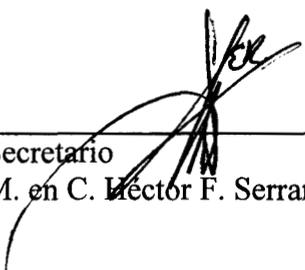
26. Bolotin-Fukuhara, M., Toffano-Nioche, C., Artiguenave, F., Duchateau-Nguyen, G., Lemaire, M., Marmeisse, R., Montrocher, R., Robert, C., Termier, M., Winker, P. & Wésolowski-Louvel, M. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. FEBS Lett. 487(1): 66-70.
27. Wesolowski-Louvel, M. & Fukuhara, H. (1995). A map of the *Kluyveromyces lactis* genome. Yeast 11(3): 211-8.
28. Sor, F. & Fukuhara, H. (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. Yeast 5:1-10.
29. Brake, A., Irvine, B., Masiarz, F. & Schultz, K. (1988). Structure of genes encoding precursors of two *Kluyveromyces lactis* transported proteins. Yeast 4:S436.
30. Saviñon-Tejeda, A. L., Ongay-Larios, L., Ramirez, J. & Coria, R. (1996). Isolation of a gene encoding a G protein α subunit involved in the regulation of cAMP levels in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Yeast 12: 1125-1133.
31. Gellissen, G. & Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. Gene 190(1): 87-97.
32. Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P. & Dalboge, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. Yeast 14(14): 1267-83.
33. Gunge, N., Murakami, K., Takesako, T. & Moriyama, H. (1990). Mating type locus-dependent stability of the *Kluyveromyces* linear pGKL plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 6(5): 417-27.
34. Rompf, R. & Kahl, G. (1997). mRNA differential display in agarose gels. BioTechniques 23(1):28-32.
35. Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257:967-971.
36. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning (A Laboratory Manual). Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 7.43-7.52 .
37. Tanaka, K., Davey, J., Imai, Y. & Yamamoto, M. (1993). *Schizosaccharomyces pombe* *map3⁺* encodes the putative M-factor receptor. Mol. Cell. Biol. 13(1):80-88.
38. Kitamura, K. & Shimoda, C. (1991). The *Schizosaccharomyces pombe* *mam2* gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* *ste2* protein. EMBO J. 10(12):3743-3751.

39. Bockaert, J. & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. Review. *EMBO J.* 18(7): 1723-9.
40. Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.
41. Bai, C. & Elledge, S. J. en - *The yeast two-hybrid system.* (1997). Edited by: Paul L. Bartel & Stanley Fields. Oxford University Press. pp. 12.
42. Schmelzle, T. & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. Review. *Cell* 103: 253-62.

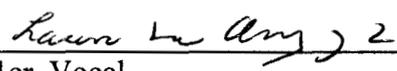
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis el día Jueves 31 de Mayo de 2001.



Presidente
Dr. Mariano García Garibay



Secretario
M. en C. Héctor F. Serrano



1er. Vocal
Dra. Laura Ongay Larios



2o. Vocal
Dra. Alma Leticia Saviñón Tejeda