

Levaduras

UNQ
Dto. de Ciencia y Tecnología
Genética Molecular

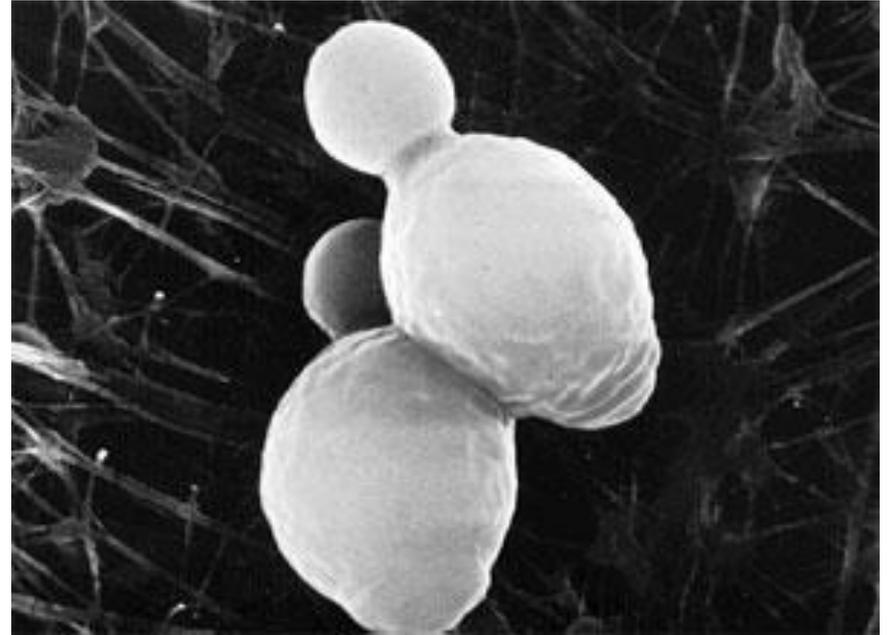
¿Qué es una levadura?

Dominio: Eukaria

Reino: Fungi

Principales características:

- Heterótrofos
- Unicelulares
- Pared celular de quitina
- Reproducción por gemación
- Genoma de DNA (cromosomas lineales) y algunas poseen un plásmido circular covalentemente cerrado extracromosómico, denominado 2μ .
- Metabolismo respiratorio (aeróbico) y fermentativo
- Simplicidad de cultivo, crecimiento rápido y bajo costo.



S. cerevisiae (microscopía electrónica de barrido)

Sistema genético que, a diferencia de la mayoría de los otros microorganismos, presenta dos fases biológicas estables: **haploide** y **diploide**.

- La fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad.
- En la fase diploide se pueden realizar estudios de complementación.

Sexo en levaduras

Hay dos tipos sexuales de levaduras:

-células “a”

-células “ α ”

El apareamiento sexual sólo puede ocurrir entre células haploides de distinto sexo.

La determinación sexual no se debe a un cromosoma distinto entre géneros sino a una diferencia en un único locus.

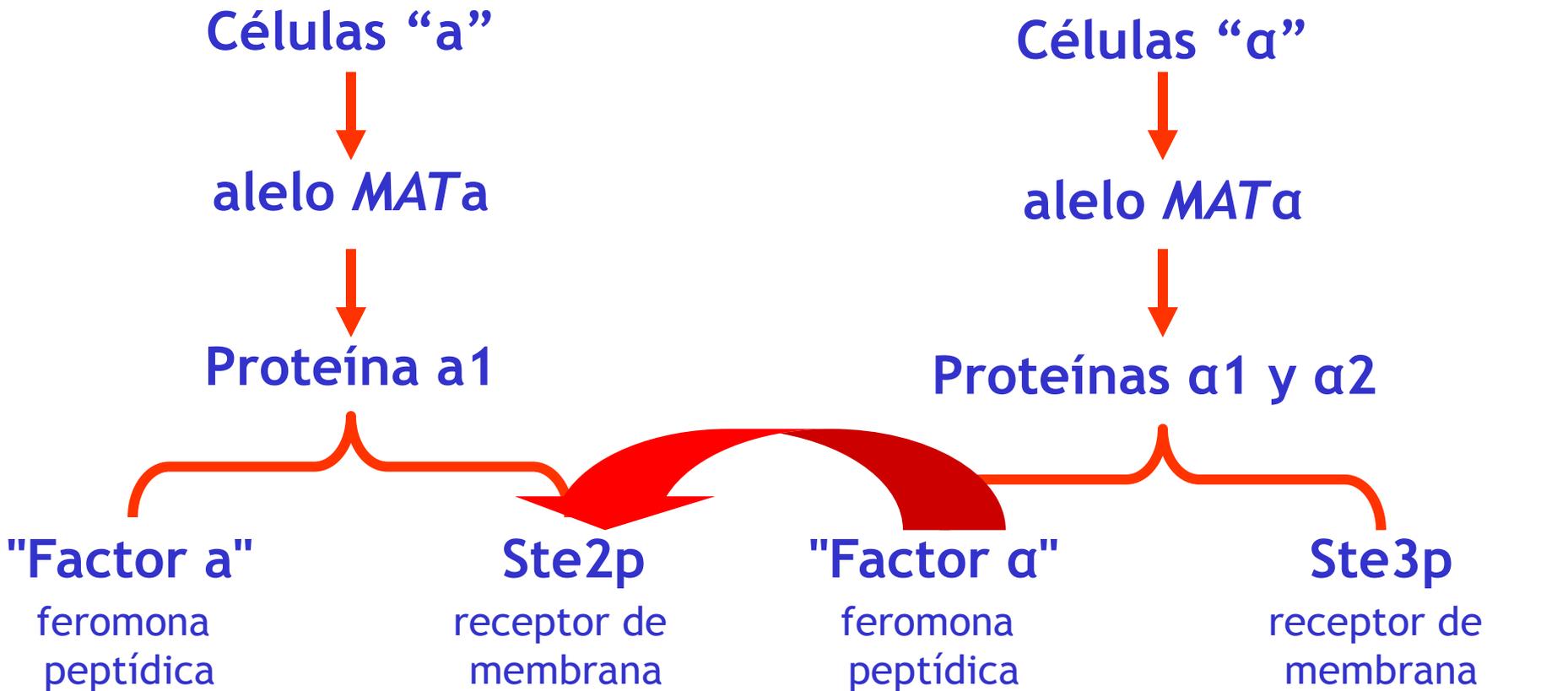
El locus se llama **MAT**, tiene 2 alelos:

-MAT_a

-MAT _{α}

gobierna el comportamiento sexual entre células haploides y células diploides.

Diferenciación celular en levaduras



Desencadenando una serie de señales intracelulares mediada por la proteína G. Por ejemplo, se desencadena la formación de una protuberancia en las células hacia la fuente de las feromonas de sexo contrario.

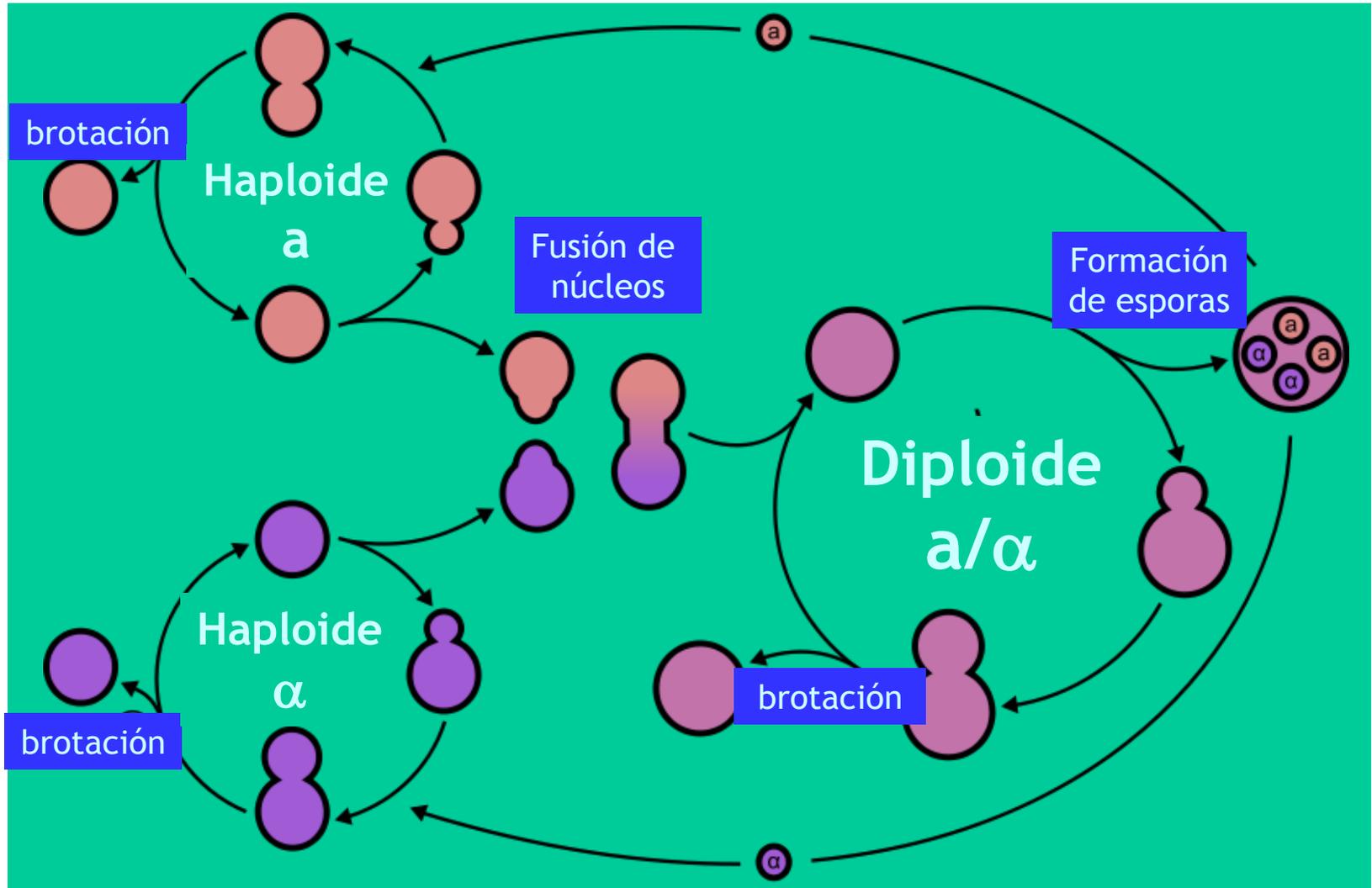
Diferencias entre células haploides y diploides

- ✓ Las células haploides (“a” y “α”) responden a la feromona producida por el sexo contrario, se fusionan y forman una **célula diploide**
- ✓ Las células **haploides no** pueden realizar **meiosis** en condiciones normales.
- ✓ Las células **diploides** no producen ni responden a ninguno de los dos tipos de feromonas pero pueden realizar **meiosis** (sólo bajo condiciones ambientales muy determinadas).
- ✓ Las diferencias en los patrones de expresión entre haploides y diploides son producidos por el locus MAT:

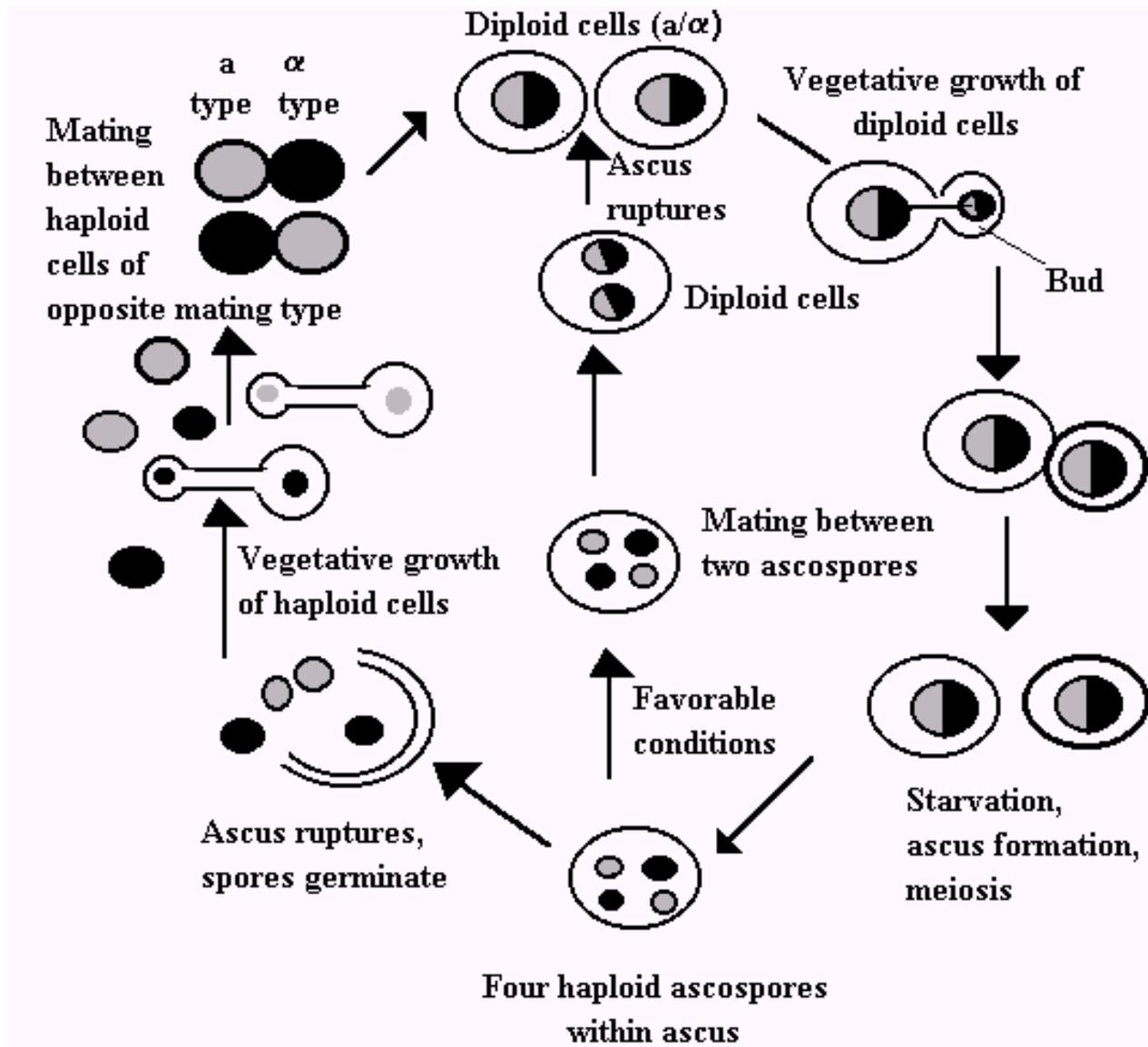
Haploides : tienen **1 copia del locus MAT** (en cualquiera de sus variantes alélicas), que determinará el sexo de la célula.

Diploides: tienen los **2 loci**. La combinación en la información contenida en ambos loci genera el programa transcripcional diploide, mediado por la combinación entre las **proteínas a1, α1 y α2**.

Ciclo sexual de *Saccharomyces cerevisiae*



Ciclo celular y reproducción sexual



Mecanismo del cambio sexual

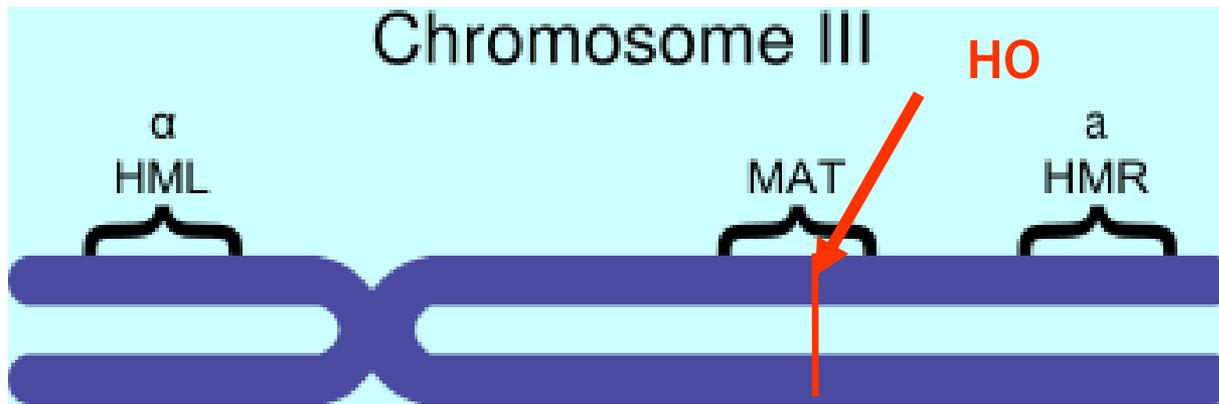
El cambio sexual se produce por la conversión génica iniciada por la endonucleasa *HO*.

La **expresión de la endonucleasa** está regulada específicamente en los haploides y **sólo es activa en las células haploides** durante la fase de ciclo celular **G1**.

1-La endonucleasa *HO* corta específicamente en el locus *MAT*.

2-Exonucleasas atacan los extremos libres generados, produciéndose la degradación del locus *MAT* en ambos sentidos.

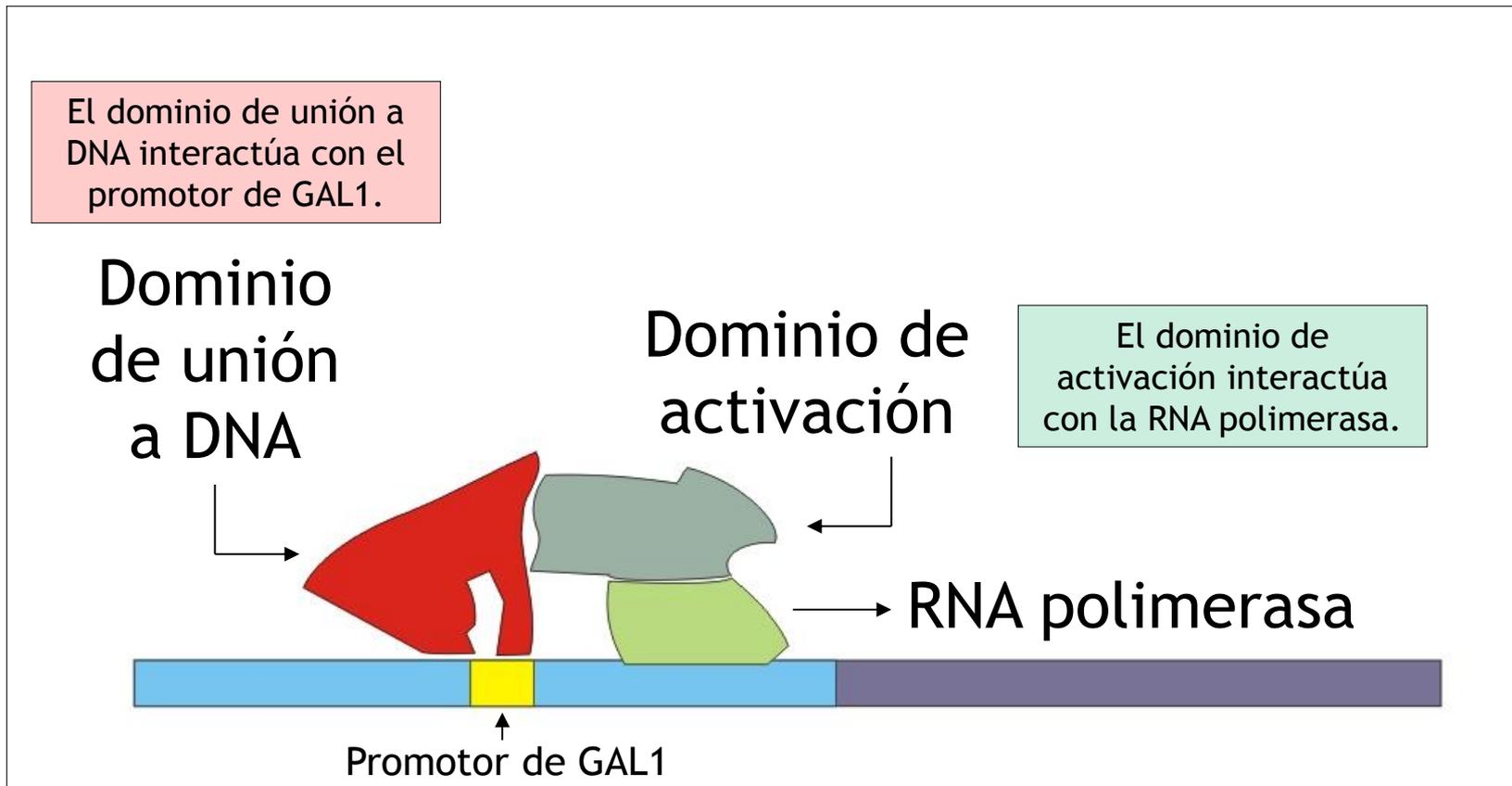
3-La activación de sistemas de reparación del ADN que reemplazan el locus ausente por una de las copias adicionales *HMR* o *HML*.



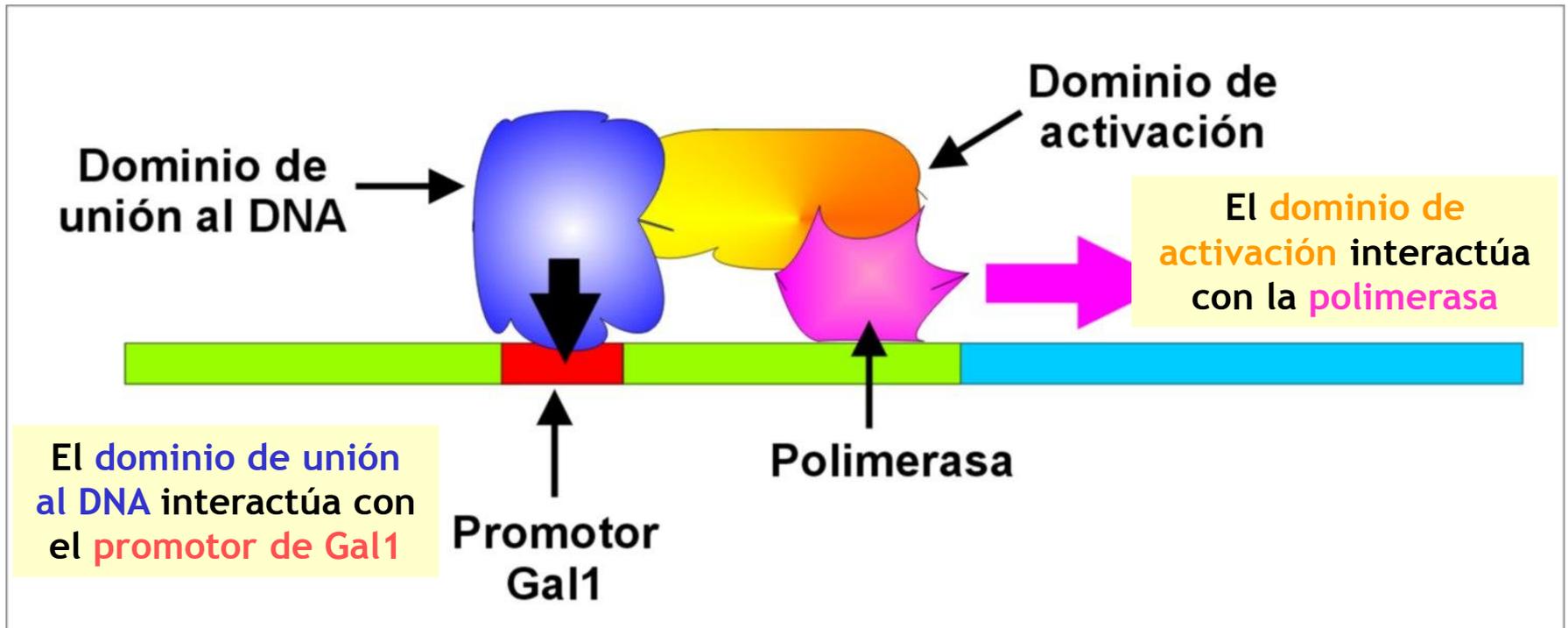
Pasando a otros usos de las levaduras

Ensayos de n-híbridos
(una herramienta para el
estudio del interactoma)

GAL4 es una proteína de levaduras que activa la transcripción de genes involucrados en la utilización de galactosa.



La proteína Gal4 posee un dominio de unión al DNA (BD) y un dominio de activación (AD)

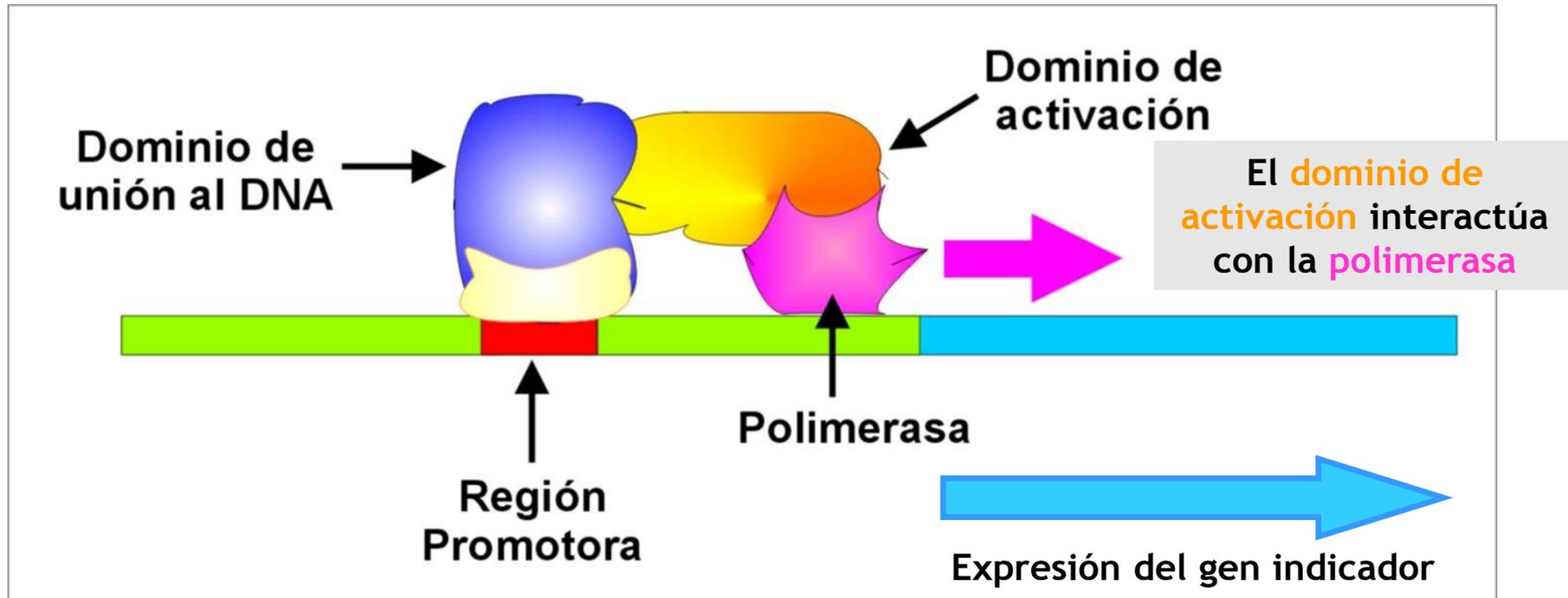


Medida de la actividad de un gen indicador (por ej. Visualización de colonias azules)

Ensayos de interacción Proteínas - DNA

**(por ejemplo, determinación de
unión a secuencias específicas)**

Ensayos de mono-híbridos



El dominio de **unión al DNA** como una fusión traduccional con el gen que codifica para otra proteína en el plásmido 1

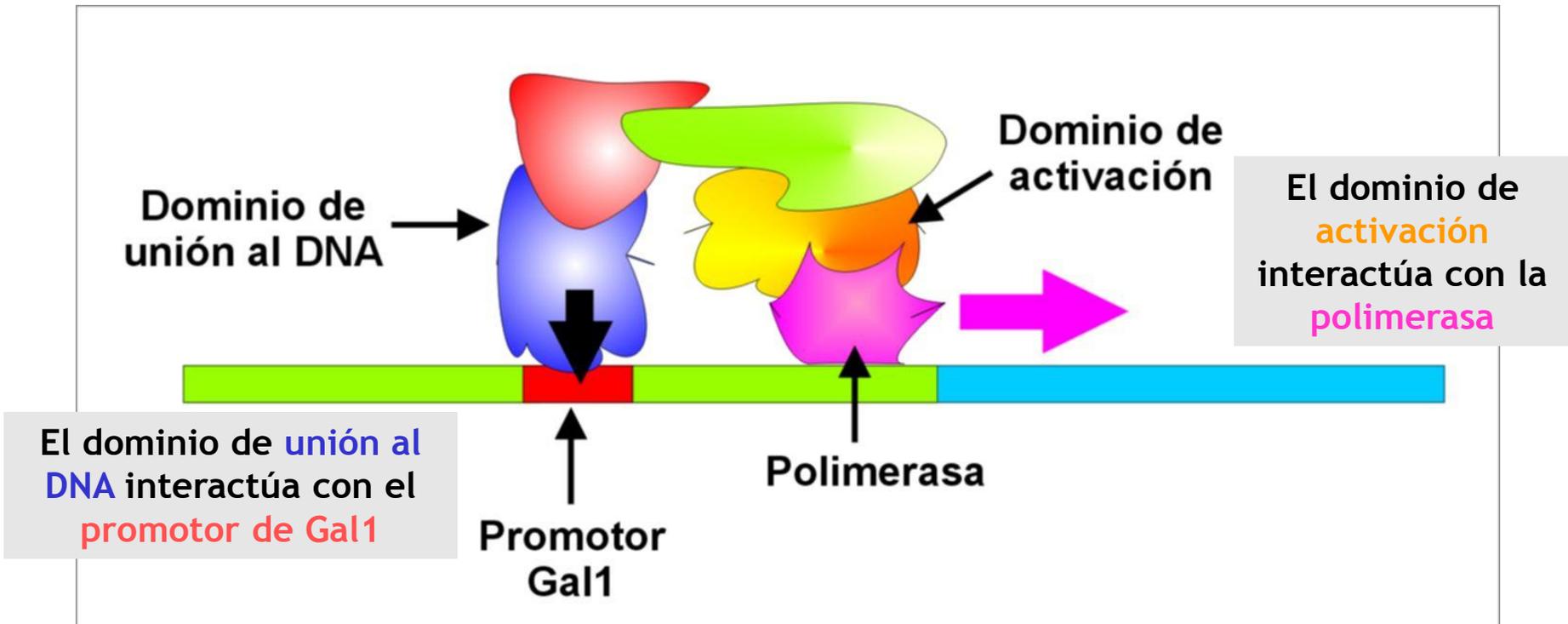


El plásmido 2 codifica para el dominio de **activación**

**Ensayos de interacción
Proteína - Proteína
(por ejemplo, determinación de
dimerizaciones proteicas)**

Ensayos de di-híbridos

Los dos dominios de la proteína Gal4 no necesitan transcribirse en una única proteína. Pueden fusionarse a otras proteínas



Medida de la actividad de un gen indicador (por ej. Visualización de colonias azules)

Ensayos de di-híbridos

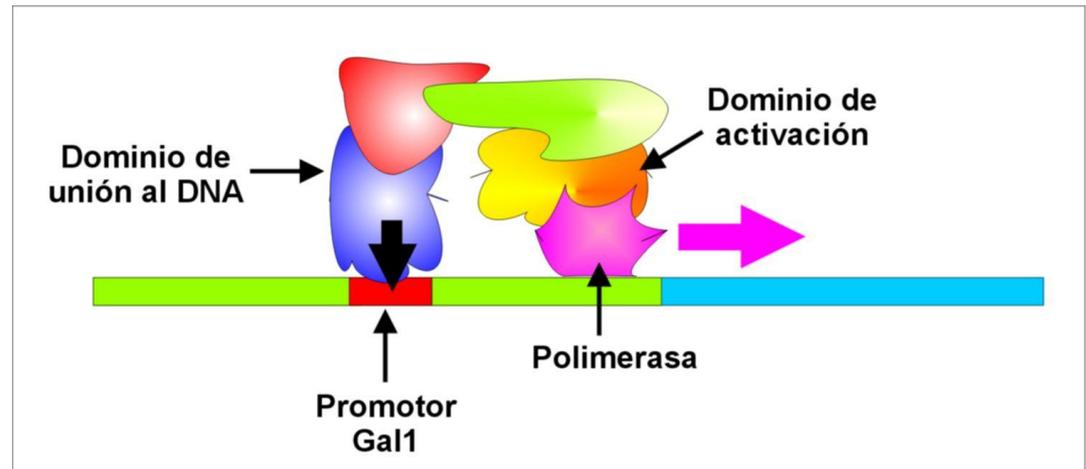
Los plásmidos que transportan las distintas construcciones se expresan en levaduras



El dominio de **unión al DNA** como una fusión traduccional con el gen que codifica para otra proteína en el plásmido 1

El dominio de **activación** como una fusión traduccional con el gen que codifica para una tercer proteína en el plásmido 2

Medida de la actividad de un gen indicador (por ej. Visualización de colonias azules)



¿Cuáles son las principales aplicaciones del sistema del Doble Híbrido?

- Análisis de proteínas conocidas para detectar su interacción con otras. Escáner de un conjunto de proteínas (**biblioteca cDNA**) que se unen a una proteína diana.
- Identificación de nuevas proteínas diana para intervención farmacéutica.
- Determinación de **residuos específicos** involucrados en la interacción entre dos proteínas. En el sistema de doble híbrido, la fuerza de activación generalmente es proporcional a la fuerza de interacción. Mutaciones en alguna de las proteínas interaccionantes disminuyen la fuerza de unión y así, la actividad “reporter” puede indicarnos residuos involucrados en el contacto proteína-proteína.
- Encontrar **compuestos exógenos** que modulen las interacciones proteicas, es decir, que las debiliten o fortalezcan. Como resultado, se esperaría que los compuestos con una interacción más débil tuvieran menor expresión de sus genes *reporter*.

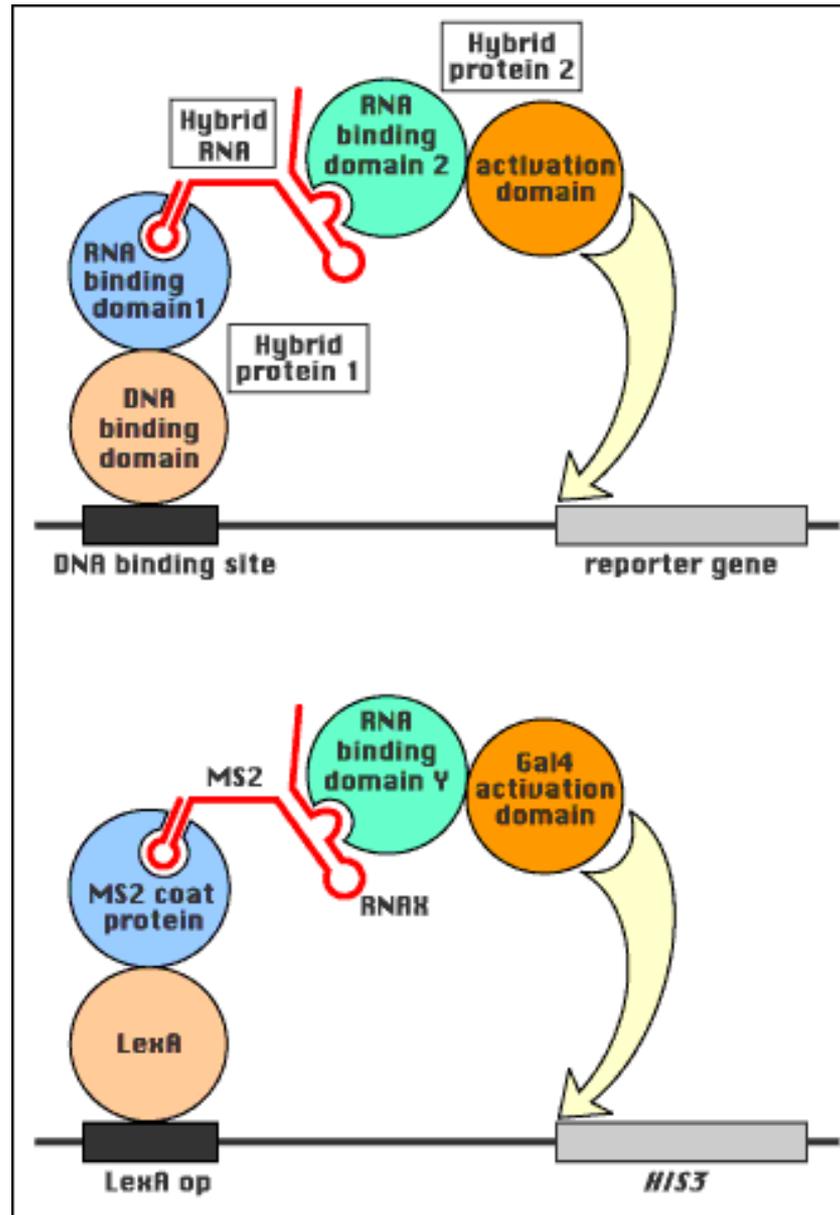
Ensayos de interacción

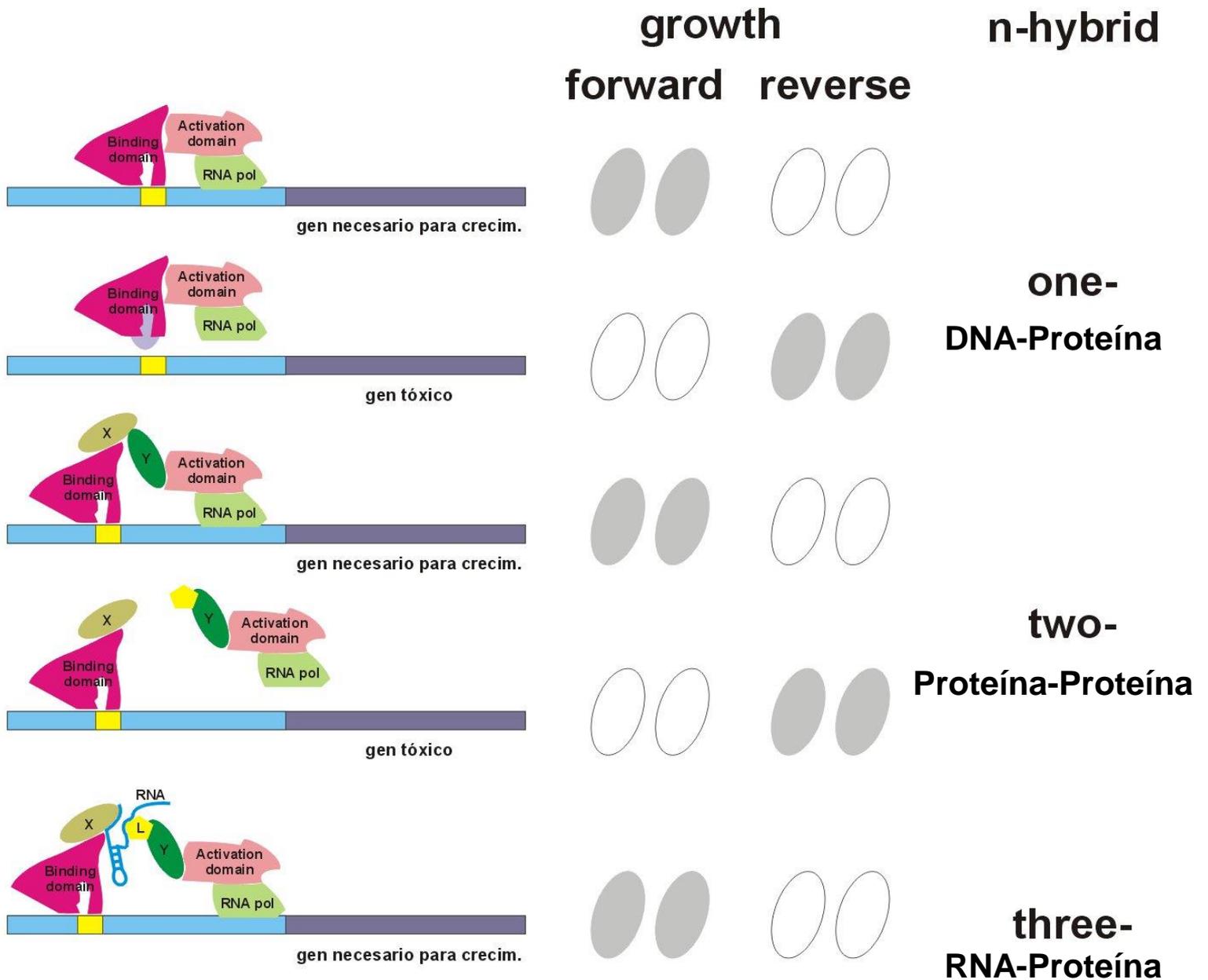
Proteína - RNA

(por ejemplo ¿???????)

Ensayos de trihíbridos

¿Cuáles son las construcciones necesarias?





Preguntas ¿????

