



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Respuesta a proteínas mal plegadas en la levadura  
*Kluyveromces lactis***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ABRIL ANGÉLICA ESCAMILLA AYALA**

Apoyado por CONACYT  
proyecto No. 80343

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA  
2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Respuesta a proteínas mal plegadas en la levadura Kluyveromyces lactis**

realizado por Escamilla Ayala Abril Angélica con número de cuenta 3-0255503-1 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Víctor Manuel Valdés López	
Propietario	Dr. José Francisco Torres Quiroz	
Propietario Tutor	Dr. Roberto Coria Ortega	
Suplente	Biól. Rebeca Gutiérrez Ordóñez	
Suplente	M. en C. Carlos Lozano Flores	

Atentamente,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D. F., a 18 de enero de 2010  
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
'nlm.



## **Agradecimientos**

A la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios, B. Sc. Guadalupe Códiz Huerta y M. Sc. D. Minerva Mora Cabrera por su excelente servicio y asistencia técnica.

A la Unidad de Cómputo por el excelente servicio que proveen facilitando el procesamiento, la comunicación y divulgación de la información.

A la Unidad de Microscopía, especialmente al Biól. Gabriel Orozco Hoyuela por su excelente servicio y asistencia técnica en microscopía confocal.

A la Dra. Laura Kawasaki por su extraordinaria asistencia técnica y académica, además de la administración del laboratorio.

A mi tutor, Dr. Roberto Coria Ortega y sinodales Dr. José Francisco Torres Quiroz, Dr. Víctor Manuel Valdés López, M. en C. Carlos Lozano Flores y Biól. Rebeca Gutiérrez Ordóñez por sus invaluable comentarios, críticas y orientación en la realización de esta tesis.

Especialmente, un agradecimiento al Dr. José Francisco Torres Quiroz por toda la asistencia técnica y académica gracias a la cual pude desarrollar y concluir mi carrera y esta tesis.

A los miembros del laboratorio 302 Ote: M. en C. Edith Sánchez Paredes, M. en C. Nancy Velázquez Zavala, Biól. Rocío Sánchez Navarro, Biól. Miriam Rodríguez González, LIBB. Ángel Emmanuel Villanueva Chimal, Natalia Martagón Calderón, Eunice Domínguez Martín, Uriel Cruz Martínez por sus comentarios, consejos y críticas en los seminarios y en el laboratorio, además del agradable ambiente de trabajo que me proporcionaron.

A la Sra. Marisela Bolaños Martínez por su apoyo técnico en el mantenimiento y proporción de todo el material necesario para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias e Instituto de Fisiología Celular por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente como Bióloga y como persona.

A mis amigos: todos los bioquitos, gente del cuadro por su apoyo y ánimo sin el cual no hubiera podido terminar la carrera; los cumitos, mis grandes amigos que a pesar de todo lo que ahora nos separa, estamos juntos más que nunca y para siempre; los tomodachis, saben que forman parte de lo que mas quiero en la vida, ustedes son mi alegría, muchas gracias; finalmente, a mis primeras amigas: las del Jean Piaget, toda la vida de amistad, apoyo y comprensión incondicional, muchas gracias por siempre estar a mi lado.

Dedicado a toda mi familia,  
especialmente: mamá, papá, abuelita, tías,  
tíos, primas, primo y umi.

*Siempre sonrían, no matter what.*

## INDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
  - 2.1. Estrés de retículo endoplásmico
    - 2.1.1. Respuesta a proteínas mal plegadas en *Saccharomyces cerevisiae*
      - 2.1.1.1. Hac1p
    - 2.2. *Kluyveromyces lactis*
3. ANTECEDENTES PARTICULARES
4. JUSTIFICACIÓN
5. OBJETIVO
6. HIPÓTESIS
7. MÉTODOS
  - 7.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo
  - 7.2. Pruebas de sensibilidad
  - 7.3. Localización del intrón de *HAC1*
    - 7.3.1. Northern blot
    - 7.3.2. RT-PCR y secuenciación
    - 7.3.3. Predicción de la estructura del RNAm
  - 7.4. Construcciones de segmentos de promotor de *KAR2* con GFP
    - 7.4.1. Construcción YEpKD1-KAR\_730-GFP
    - 7.4.2. Construcción YEpKD1-KAR\_479-GFP
    - 7.4.3. Construcción YEpKD1-KAR\_281-GFP
    - 7.4.4. Construcción YEpKD1-GFP
  - 7.5. Citometría de flujo
  - 7.6. Microscopía confocal
  - 7.7. Western blot de construcciones de *KAR2*
8. RESULTADOS
  - 8.1. Sensibilidad de la cepa silvestre, *Δire1* y *Δhac1* a agentes que inducen estrés de retículo y auxotrofia para inositol
  - 8.2. Procesamiento del RNAm de *HAC1*
  - 8.3. Análisis de la secuencia

8.4. Expresión de *KAR2* en respuesta a 2-desoxi-D-glucosa

## 9. DISCUSIÓN

9.1. Sensibilidad de las mutantes *Δire1* y *Δ hac1* a estrés de retículo y auxotrofia para inositol

9.2. Procesamiento del mensajero de *HAC1*

9.3. Localización de la posible secuencia de unión de Hac1p al promotor de *KAR2*

## 10. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

## 11. ANEXOS

11.1. Diagrama general de procesos

11.2. Tabla completa de micrografías de la respuesta del promotor de *KAR2*

## 12. ABREVIATURAS

## 13. BIBLIOGRAFÍA

## 1. RESUMEN

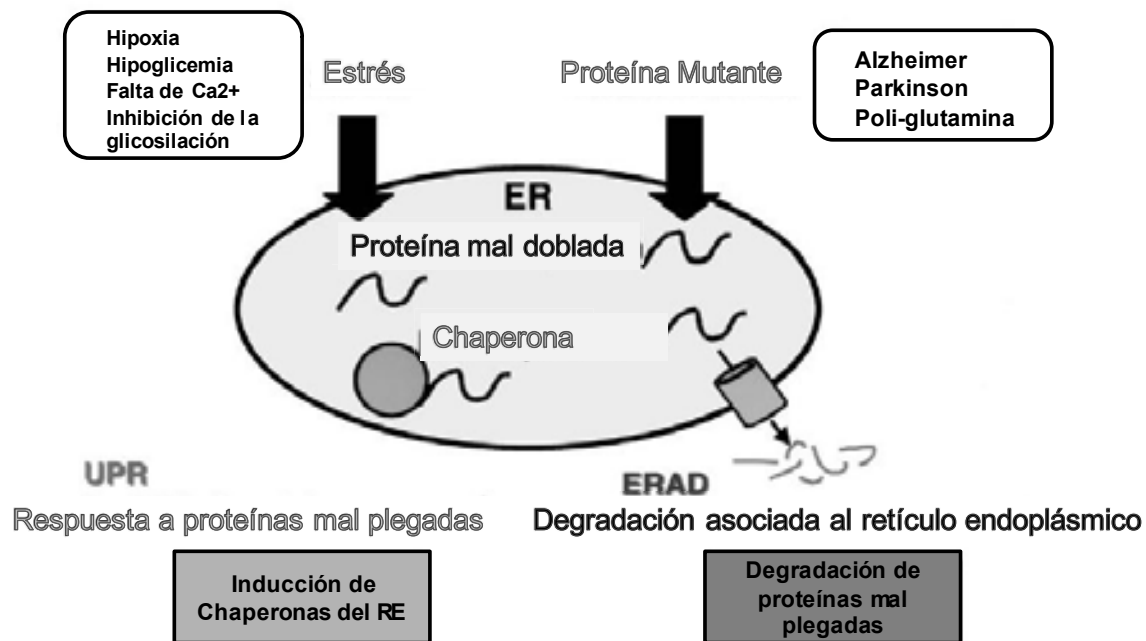
La perturbación a las funciones normales del retículo endoplásmico induce una respuesta a estrés encontrada en todos los eucariontes, llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En levadura se han encontrado dos genes cuyos productos son clave para la respuesta, *IRE1* y *HAC1*. Esta respuesta, muy estudiada en *S. cerevisiae*, se ha encontrado imprescindible a lo largo de la escala filogenética, con diferentes implicaciones. En este trabajo se caracterizó la UPR en *K. lactis* haciendo énfasis en el procesamiento del mensajero de *HAC1*. También se identificó el intrón de *HAC1* y se modeló la estructura secundaria que posiblemente regula la atenuación de la traducción. Finalmente, se localizó una región en el promotor de *KAR2*, un gen que codifica para una chaperona inducida en la UPR, que contiene el posible sitio de unión de Hac1p y se propone una secuencia de unión de Hac1p en los genes de UPR en *K. lactis*.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Estrés de retículo endoplásmico

En eucariontes, el retículo endoplásmico es el compartimiento donde las proteínas de la vía secretora y transmembranales adquieren su conformación nativa y pasan por una serie de modificaciones posttraduccionales como la glicosilación ligada a asparagina (N-glicosilación) (Hubbard *et al.*, 1981; Kornfeld *et al.*, 1985; citados en Weerapana *et al.*, 2005) y la formación de enlaces disulfuro intra e inter molecular (Fewell *et al.*, 2001). Este proceso es asistido por chaperonas moleculares y enzimas de plegamiento localizadas en el lumen del retículo (Gething y Sambrook, 1992; Helenius, 1992). Antes de ser liberadas a su destino final, las proteínas secretadas son inspeccionadas por la maquinaria de control de calidad asociada al retículo. Si la célula se encuentra con alguna situación de estrés como choque térmico, anoxia, exposición al frío, privación de glucosa, infección viral o tratamiento con análogos de aminoácidos se provoca el mal plegamiento de las proteínas (Fig. 1) (Mori *et al.*, 1992).



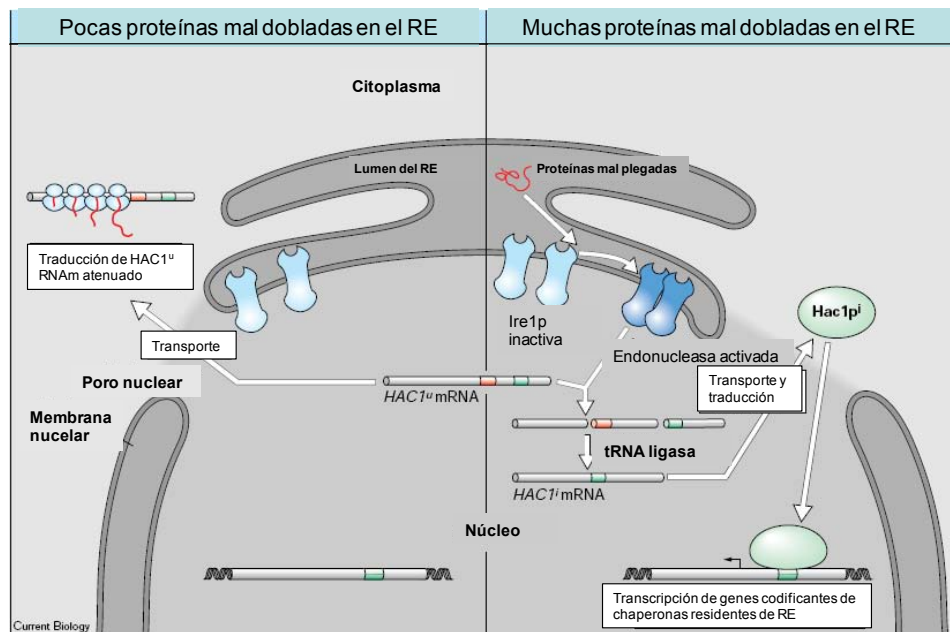
**Fig. 1 Estrés del Retículo Endoplásmico.** Las proteínas mal plegadas se pueden acumular en el lumen del retículo endoplásmico ya sea por estrés o por algunas enfermedades que generan mutaciones en proteínas. La célula tiene dos vías de respuesta a este problema, la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) donde las proteínas mal plegadas son degradadas en el citoplasma, y la respuesta a proteínas mal plegadas que induce la producción de chaperonas que puedan resolver el mal plegamiento. (Adaptado de: Kaneko y Nomura, 2003)

Así, el estrés de retículo endoplásmico se caracteriza por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de dicho compartimiento (Kozutsumi *et al.*, 1988). Los

polipéptidos no plegados o mal plegados acumulados en el retículo endoplásmico pueden ser retro-translocados del retículo al citoplasma donde son ubiquitinados y destruidos vía el proteosoma en un proceso llamado degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés; Kopito, 1997; Plemper y Wolf, 1999). También se puede liberar una señal a nivel transcripcional para aumentar la capacidad de plegamiento del retículo, y se atenúa la traducción para disminuir la carga de proteínas. Estos procesos en conjunto reciben el nombre de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés; Kaufman, 1999; Mori, *et al.*, 2000; Urano *et al.*, 2000a; Patil y Walter, 2001).

### 2.1.1. Respuesta a proteínas mal plegadas en *Saccharomyces cerevisiae*

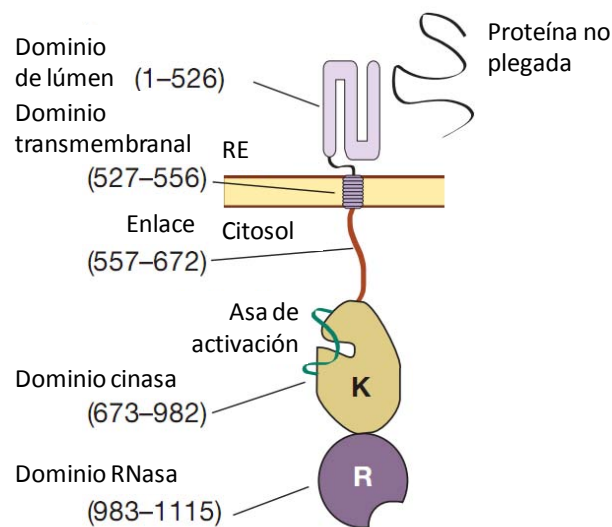
La UPR (Fig. 2) se ha conservado a través de la evolución desde levaduras hasta mamíferos. En *S. cerevisiae* la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico induce la transcripción de genes que codifican para proteínas relacionadas con procesos de translocación, glicosilación y degradación de proteínas secretoras, metabolismo de lípidos e inositol, biogénesis de la pared celular, tráfico y transporte vesicular, así como la clasificación de proteínas vacuolares (Travers *et al.*, 2000).



**Fig. 2 Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR).** En estado normal, donde hay pocas proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico, el RNAm de *HAC1* ve atenuada su traducción gracias a la presencia de un intrón. Pero en presencia de una gran cantidad de proteínas mal plegadas en el retículo, éstas se asocian al dominio del lumen de Ire1p llevando a su oligomerización y la activación de su actividad de endonucleasa con la que procesa el intrón del RNAm de *HAC1*. Posteriormente la tRNA ligasa une los exones, con lo cual se procesa el intrón y se traduce el mensajero. El factor de transcripción Hac1p regresa al núcleo para inducir genes blanco de la UPR. (Adaptado de: Shamu, 1998)

La UPR no es una respuesta de todo o nada al estrés, sino que se ajusta a la cantidad de doblamiento erróneo que ocurre en el retículo, que probablemente permita a la célula conservar energía en tiempos de estrés menor (Casagrande *et al*, 2000). Por ello se dice que la UPR puede ser más que una vía de respuesta, ya que puede ejecutar o estar relacionada con programas celulares, como la vía ERAD, que permiten a la célula mantener la homeostasis (Nunnari y Walter, 1996).

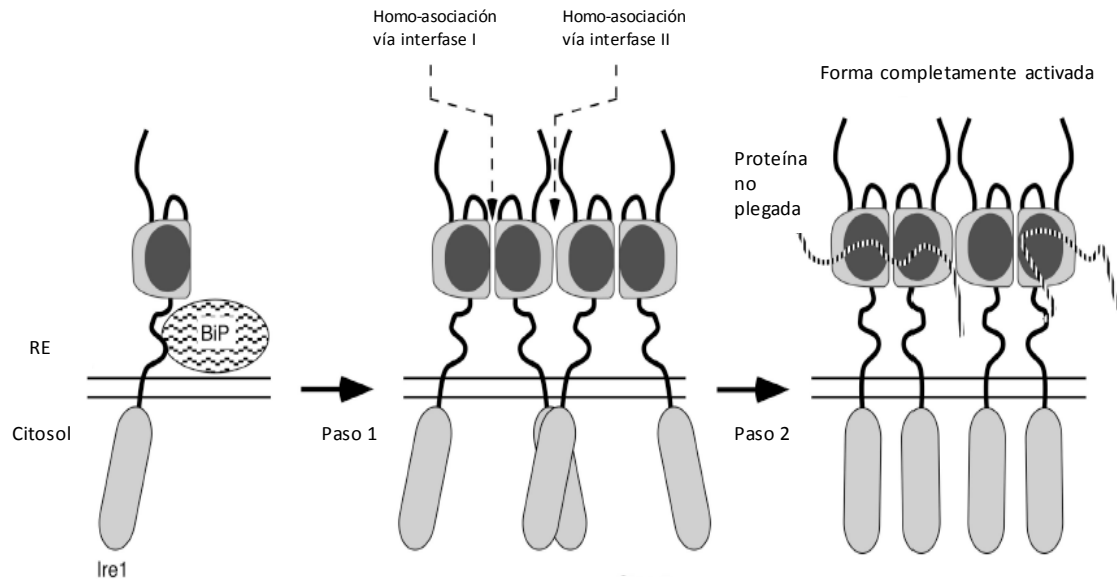
La UPR se activa por el aumento en la cantidad de proteínas desdobladas en el retículo endoplásmico. Esta acción se lleva a cabo por medio de la proteína Ire1 que se encuentra inmersa en la membrana del retículo. Ésta tiene un dominio glicosilado N terminal en el lumen del retículo y un dominio cinasa/endoribonucleasa C terminal que mira al citoplasma o nucleoplasma (Fig. 3).



**Fig. 3 Estructura de Ire1p en Levadura.** En morado claro se muestra el dominio de lumen de retículo que se puede asociar a proteínas no plegadas, le sigue un dominio transmembranal y una cadena de unión a los dominios cinasa (K) y RNasa (R) que están en el citosol. En el dominio cinasa se encuentra el sitio de fosforilación y unión de ADP-Mg marcado como asa de activación. Entre paréntesis se indican los aminoácidos que comprenden al dominio señalado. (Adaptado de: Korennykh *et al.*, 2009)

Se cree que la chaperona BiP monomérica se encuentra anclada al dominio del lumen cuando la carga de proteínas mal dobladas está en condiciones normales (Kohno *et al.*, 1993; Okamura *et al.*, 2000). Al generarse estrés de retículo, BiP se desprende y se asocia con una proteína mal plegada. Esto deja libre a Ire1p para su oligomerización y

fosforilación por moléculas Ire1p aledañas (Fig. 4) (Shamu y Walter, 1996; Welihinda y Kaufman, 1996; Kimata *et al.*, 2007) lo que conduce a la activación de la UPR.



**Fig. 4 Modelo de Activación de Ire1p por Estrés de Retículo.** Paso 1, por el aumento de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo, BiP se disocia de Ire1p y ésta se activa formando aglomerados con otras proteínas Ire1 aledañas. En el paso 2, la interacción directa de proteínas mal dobladas con Ire1p, produce cambios en la orientación de su dominio citosólico, haciendo funcional el dominio endoribonucleasa y, por lo tanto, activando la UPR. (Adaptado de: Kimata *et al.*, 2007)

El RNAm de *HAC1*, que se transcribe constantemente, se asocia al dominio endoribonucleasa de Ire1p cuando ésta forma oligómeros. De esta manera, se lleva a cabo el corte del intrón del RNAm (Cox y Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996) y posteriormente, con ayuda de la RNA ligasa Rlg1p (una tRNA ligasa) (Sidrauski *et al.*, 1996) se unen los exones formando el RNAm maduro y permitiendo su traducción. El factor transcripcional Hac1p se dirige al núcleo y actúa *in trans* sobre el elemento de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE) presente en la región promotora de muchos genes regulados por la UPR (Mori *et al.*, 1992, 1998; Patil *et al.*, 2004).

Uno de los genes inducidos por la UPR, es el de la proteína BiP codificada por el gen esencial *KAR2* (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Nicholson *et al.*, 1990) perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico (HSP70). Esta familia abarca del 5% al 10% de las proteínas residentes del lumen del retículo endoplásmico de células eucariontes (revisado por Gething y Sambrook, 1992). BiP promueve el correcto plegamiento y ensamblaje de polipéptidos nacientes, incluyendo proteínas de secreción y de



1993; Mori *et al.*, 1992). Contiene una secuencia GAA localizada río arriba del UPRE que se ha descrito como importante para la actividad de éste.

**KAR2** -131 GGAACTGGACAGCGTGTCGAAA -110

**Fig. 6 Elemento de Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPRE) en KAR2.** Los números en negativo a ambos lados indican la localización de la secuencia en relación con el sitio de inicio de la traducción (+1; no mostrado en la figura). Las flechas indican la secuencia semi palindrómica del nucleótido 10 al 16 con un nucleótido de separación marcado con un punto. Esta secuencia y los nucleótidos subrayados, son los más importantes y críticos para la función de la secuencia UPRE. (Tomado de: Mori *et al.*, 1998)

Dada ésta detallada caracterización del promotor de *KAR2*, se puede emplear muy bien como reportero de la inducción de la UPR de manera experimental.

En levadura la UPR puede ser activada experimentalmente evitando la glicosilación de proteínas tratando a las células con tunicamicina (Tm) o 2-desoxi-D-glucosa (2-DG); previniendo la formación de enlaces disulfuro con agentes reductores como  $\beta$ -mercaptoetanol y ditioneitol (DTT); induciendo la expresión de proteínas secretoras mutantes con plegamiento defectuoso o con la presencia de ionóforos de calcio que eliminan el calcio almacenado en el retículo (Tabla 1) (Cox *et al.*, 1993).

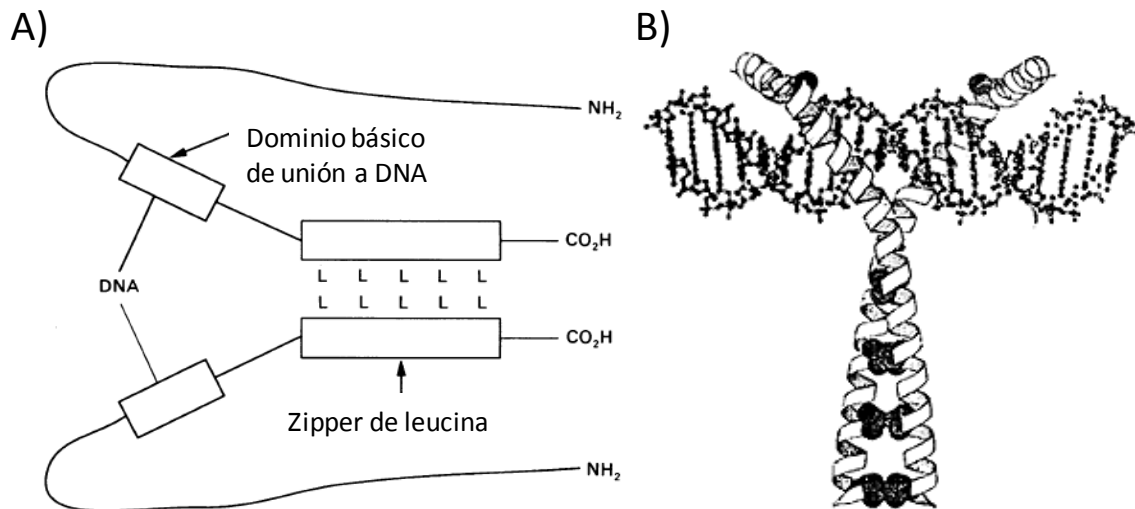
En general, se realizan pruebas con más de un agente inductor de estrés ya que, el DTT y el  $\beta$ -mercaptoetanol por ejemplo, generan efectos no específicos para el estrés de retículo endoplásmico. El agente más específico es la tunicamicina, que bloquea la enzima UDP-N-acetil-glucosamina-1-P transferasa codificada por el gen *Alg7* evitando la transferencia del grupo Glc-Nac-P del UDP-GlcNac al dolicol-pirofosfato (Dol-P) en el primer paso de la vía del dolicol para la N- glicosilación de péptidos nacientes (Burda y Aebi, 1999).

**Tabla 1. Sustancias Inductoras de Estrés de Retículo y sus Efectos. (Travers *et al.*, 2000)**

<b>Droga</b>	<b>Efecto primario</b>	<b>Efecto secundario</b>
2-desoxi-D-glucosa (2-DG) Placas: 1-5mM Líquido: ≥ 10mM Stock: 1M, estable a TA	Inhibidor competitivo de la incorporación de D-manosa en el enlace dolicol-pirofosfato del oligosacáridos central, resultando en la baja glicosilación de cadenas polipeptídicas nacientes. La inhibición es revertida con exceso de D-manosa. Competitivamente inhibe la incorporación de D-glucosa en D-glucosil-fosforil-dicol. Reduce los niveles de ATP mediante la inhibición de glucólisis y puede inhibir el ciclo ADP-ATP de las chaperonas moleculares.	Inhibe la síntesis de componentes de pared celular, ej. glucano y manosa. Incorporada a los oligosacáridos unidos por dolicol-pirofosfato, puede cambiar las propiedades de éste y otros oligosacáridos unidos en anímo. Estimula la degradación de glucógeno Interfiere con el metabolismo y la sensibilidad del carbono.
Ditiotreitol (DTT) Líquido: ≥ 3mM Stock: 1M, guardar en alícuotas de un solo uso a -20°C, preferentemente bajo un gas inerte	Reduce los enlaces disulfuro.	Libera de la célula proteínas de la pared celular y compuestos de bajo peso molecular. Disminuye el potencial electroquímico y el gradiente de protones en el plasma y las membranas vacuolares. Induce proteínas antioxidantes. Inhibe la adenosin cinasa.
β-Mercaptoetanol Líquido: 10-100mM Stock: 14.3M, guardar a 4°C en un desecador, preferentemente bajo un gas inerte	Reduce los enlaces disulfuro	Libera de la célula proteínas de la pared celular y compuestos de bajo peso molecular. Disminuye el potencial electroquímico y el gradiente de protones en el plasma y las membranas vacuolares. Induce proteínas antioxidantes. Inhibe la adenosin cinasa.
Tunicamicina Placas: 0.1-0.5 µg/ml Líquido: 10-50 mg/ml en dimetilsulfoxido (DMSO), guardar en porciones pequeñas a -20°C	Inhibidor competitivo y no competitivo de Alg7p, que cataliza la adición de 2-N-acetil-D-glucosaminil-1-fosfato a dolicolfosfato; bloquea completamente la glicosilación de polipéptidos nacientes. La inhibición es irreversible dada la inserción de la tunicamicina a membranas. A ≥2µg/ml inhibe la incorporación de D-glucosa a d-glucosil-fosforil-dolicol.	Daña la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Induce la degradación de DNA y RNA. Inhibe la síntesis de componentes de la pared celular. Inhibición de gemación.

### 2.1.1.1. Hac1p

En *S. cerevisiae*, el factor de transcripción con un “zipper” de leucina básico Hac1p es responsable de la inducción transcripcional de casi todos los genes blanco de la UPR (Cox y Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996), que comprende aproximadamente el 6% del total de los genes de levadura (Travers *et al.*, 2000). Como miembro de la familia bZIP de factores de transcripción, es posible que funcione como dímero en el cual dos subunidades se unen vía un zipper de leucina (Fig. 7).

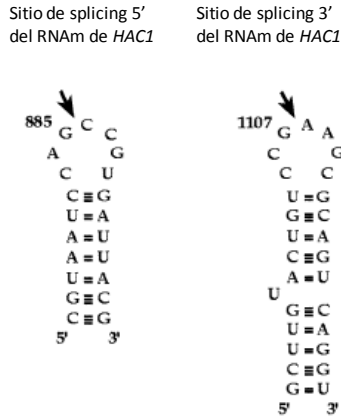


**Fig. 7 Estructura de un Factor de Transcripción Zipper de Leucina Básico y su Dominio de Unión al DNA.** A) Diagrama esquemático indicando cómo la dimerización de dos moléculas de un factor de transcripción, vía el motivo zipper de leucina, alinea el dominio de unión a DNA adyacente en la correcta orientación para unirse al DNA. B) Esquema 3-D de cómo el factor de transcripción con un zipper de leucina básico se une al DNA. (Tomado de: Latchman, 1990)

*HAC1* se transcribe constantemente durante el ciclo celular de la levadura (Nojima *et al.*, 1994) aunque su expresión se aumenta durante las últimas fases de la meiosis, lo que puede reflejar una necesidad adicional por membrana de retículo para envolver las esporas en desarrollo.

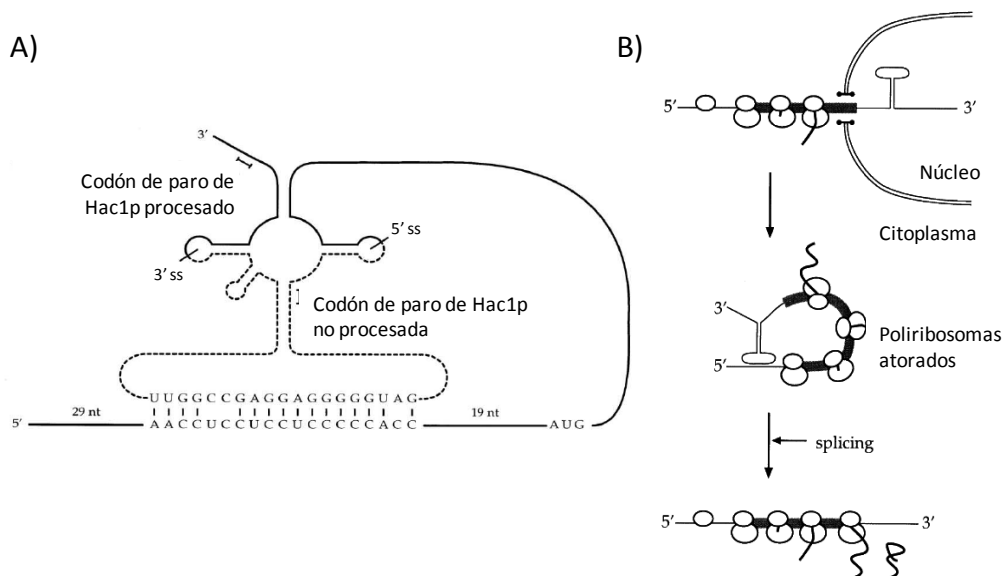
El RNAm de *HAC1* se sintetiza constitutivamente como un precursor con un intrón y se procesa en respuesta a estrés de retículo endoplásmico (Cox y Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997). Las secuencias alrededor de los sitios de splicing no corresponden con la secuencia consenso de un “splicing” convencional (Cox y Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997) y es independiente de spliceosoma. En este caso, es Ire1p quien se encarga de procesar el intrón. Por medio de la estructura secundaria que toma el mensajero, Ire1p ancla al RNAm de *HAC1* a su dominio endoribonucleasa el cual realiza dos cortes endonucleolíticos (indicados por las flechas en la fig. 8). Posteriormente la tRNA ligasa Rlg1p se encarga de unir los exones liberados, generando el mensajero maduro (Sidrauski *et al.*, 1996; Sidrauski y Walter, 1997; Kawahara *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 1999). Por ello se dice que el procesamiento del mensajero de *HAC1* representa un sistema único de “splicing” en eucariontes.





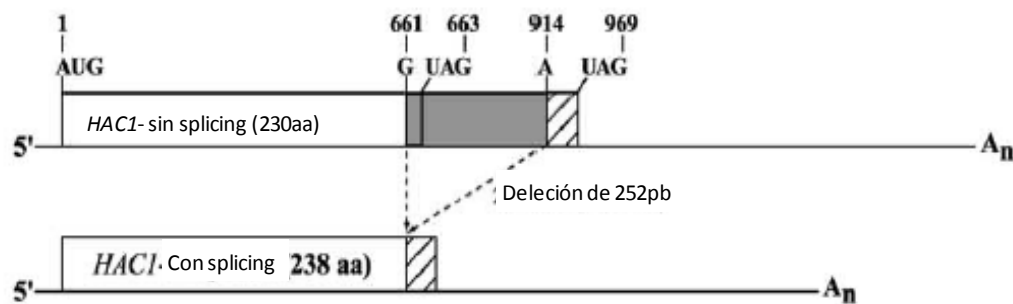
**Fig. 8 Sitios de Anclaje de la Endorribonucleasa de Ire1p para Splicing Atípico.** Predicción de las estructuras tallo asa y sus sitios de splicing 5' y 3'. Los sitios de splicing de Ire1p están indicados por las flechas. (Adaptado de: González *et al.*, 1999)

El splicing regula la síntesis activa de Hac1p a dos niveles. Primero Hac1p se sintetiza solo después de que ocurra el splicing pues el intrón bloquea la traducción del RNAm de *HAC1* (Chapman y Walter, 1997; Kawahara *et al.*, 1997). Se cree que el apareamiento de bases entre el intrón del RNAm de *HAC1* y la UTR 5' es la clave para prevenir que Hac1p sea sintetizado a menos que el intrón sea eliminado. Se ha visto que la traducción de Hac1p se inicia con asociación de poliribosomas, pero éstos se detienen en el RNAm antes de que se complete la traducción (Fig. 9) (Rüegsegger *et al.*, 2001).



**Fig. 9 Modelo de Atenuación de la Transcripción del RNAm de *HAC1*.** A) Esquema del RNAm de *HAC1* en donde la UTR 5' y el intrón contienen secuencias complementarias. Las secuencias exónicas se muestran en líneas sólidas y las secuencias intrónicas como líneas punteadas. La estructura secundaria mostrada se basa en predicciones pero los sitios de splicing ya se han localizado experimentalmente en estructuras tallo asa por González y colaboradores (1999). El modelo no está dibujado a escala. ss: sitio de splicing. B) Modelo de atenuación que genera la detención de los ribosomas y su liberación por splicing citoplásmico (Adaptado de: Rüegsegger *et al.*, 2001).

En segundo lugar, la actividad del activador transcripcional Hac1p traducido del RNAm maduro es mucho más fuerte que aquella del RNAm precursor, pues el dominio de unión al DNA codificado por el primer exón es unido con el dominio activador codificado por el segundo exón como resultado del splicing (Mori *et al.*, 2000). El intrón de 252 nucleótidos es eliminado de un RNAm precursor de 1.4kb para producir un RNAm maduro de 1.2kb. El splicing hace que se remplace la porción del C terminal de Hac1p. El RNAm precursor codifica para una proteína de 230 aa, mientras que el RNAm maduro lo hace para una de 238 aa por lo que ambos comparten 220 aa del N terminal (Fig. 10) (Kawahara *et al.*, 1997; Chapman y Walter, 1997; Pal *et al.*, 2007). Hac1p es muy inestable *in vivo*, lo que hace que se apague rápidamente la UPR cuando las condiciones de estrés se han acabado (Kawahara *et al.*, 1997). Este control es necesario pues la inducción inapropiada de la UPR en ausencia de proteínas mal plegadas en el retículo es tóxica para las células (Cox y Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997).



**Fig. 10 RNAm de HAC1 Inmaduro y Maduro en *S. cerevisiae*.** Representación esquemática de la forma no procesada y procesada del RNAm de HAC1 mostrando su sitio de splicing y el primer codón de término que cae en la región del intrón. (Adaptado de: Back *et al.*, 2005)

La UPR es rápida y sensible, el “splicing” se lleva a cabo en 10 minutos después de la inducción del estrés de retículo. El mismo promotor de HAC1 lleva un UPRE funcional al cual Hac1p se puede unir directamente. Así Hac1p puede regular positivamente su propia transcripción mientras Hac1p se esté sintetizando bajo condiciones de estrés. Esta autorregulación es requerida para mantener niveles altos de RNAm de HAC1 y así proteger a las levaduras de un estrés de retículo prolongado (Ogawa y Mori, 2004).

## 2. 2 *Kluyveromyces lactis*

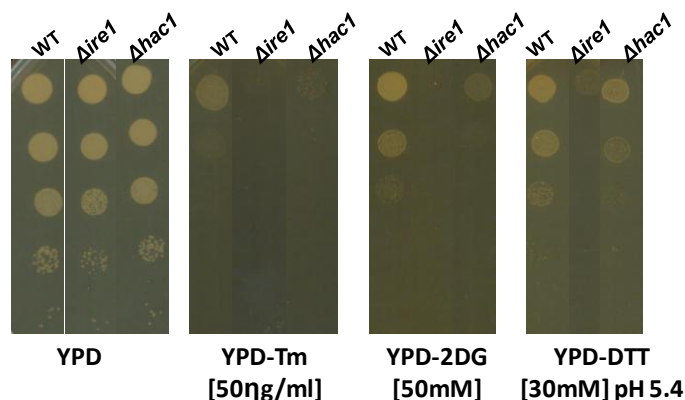
Es una levadura de la familia Saccharomycetaceae (<http://srs.ebi.ac.uk>), de forma esférica ovalada relativamente más pequeña que *Saccharomyces cerevisiae* (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). Posee la característica de formar ascas que rodean a las 4 esporas resultantes de la reproducción sexual. Sus cultivos son fácilmente diferenciados por su olor frutal que sugiere la presencia de ésteres de ácidos orgánicos y su principal fuente de carbono es la lactosa.

Es esencialmente aerobia y clasificada como especie *petite* negativa, dado que no puede sobrevivir sin DNA mitocondrial que requiere para formar proteínas intermembranales que mantienen el gradiente electroquímico de la mitocondria durante la respiración.

*K. lactis* tiene importancia en la industria para la producción de quimosina para la producción de queso. Además se usa para estudios de genómica comparada por su fácil cultivo, genoma compacto y pequeño, fácil manipulación de ciclo de vida, genoma completamente secuenciado y su posición en la escala filogenética. Además, cuenta con un sistema de modificaciones post traduccionales semejante al de eucariontes superiores, por lo que algunos estudios pueden extrapolarse a éstos.

### 3. ANTECEDENTES PARTICULARES

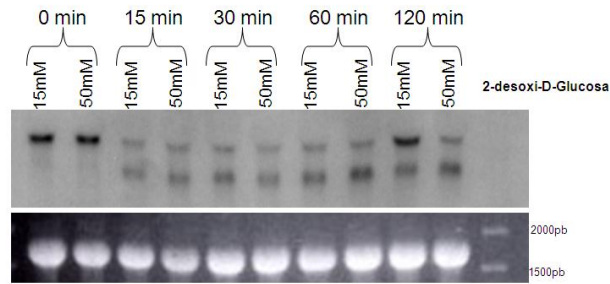
En estudios previos (Torres-Quiroz, 2009, sin publicar) se interrumpieron los genes *IRE1* y *HAC1* posiblemente involucrados en la UPR de *K. lactis*. Se expusieron estas cepas a agentes causantes de estrés de retículo, como tunicamicina (Tm), 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) y ditioneitol (DTT) a diferentes concentraciones para determinar el umbral al cual las mutantes muestran sensibilidad. Se encontró que las cepas  $\Delta ire1$  y  $\Delta hac1$  de *K. lactis* son sensibles a 50 ng/ml de Tm, a 50 mM de 2-DG y a 30 mM de DTT.



**Fig. 13 Fenotipos de las Mutantes de *IRE1* y *HAC1* en Diferentes Medios.** Los goteos muestran primero, el crecimiento de la WT y las mutantes *IRE1* y *HAC1* en medio rico (YPD) y otras tres placas con agentes inhibidores de la N-glicosilación, 50 mM de 2-desoxi-D-glucosa, 50 ng/ml de tunicamicina o 30 mM pH 5.4 de DTT, mostrando la sensibilidad de ambas mutantes (Torres-Quiroz).

Esto indicó que Ire1p y Hac1p de *K. lactis* sí juegan un papel importante en la protección a agentes que inducen estrés de retículo endoplásmico.

Para determinar si existía un procesamiento del mensajero de *HAC1* dependiente de estrés de retículo, se hizo una hibridación tipo Northern blot con RNA total extraído a diferentes tiempos de exposición a 15 mM y 50 mM de 2-DG (Fig. 14). Se encontró que a partir de los 15 minutos se evidencian dos formas del mensajero de *HAC1* que probablemente corresponden al RNAm sin procesar (1100 pb aproximadamente) y al procesado (800 pb), que indica que el tratamiento con 2-DG induce el procesamiento. En el mismo experimento se observó un aumento en la concentración de mensajero sin procesar al minuto 120, lo que sugirió una adaptación al estrés. Además la banda pequeña se mantuvo constante en su concentración, lo cual indicó que hay un procesamiento sostenido del mensajero.



**Fig. 15 Hibridación Tipo Northern del Mensajero de *HAC1* tras la Inducción de Estrés de Retículo.** Al RNA total extraído a diferentes tiempos (0', 15', 30', 60' y 120') de células WT incubadas con 2-DG 15 mM o 50 mM se le realizó una hibridación tipo Northern para el mensajero de *HAC1* (Torres-Quiroz).

Estos experimentos dieron la pauta para continuar la búsqueda de un mecanismo atípico de splicing para un factor transcripcional de respuesta a estrés de retículo endoplásmico en *K. lactis* similar a los ya reportados y a cuestionarse si *K. lactis* pudiera tener diferencias en esta respuesta dado que los fenotipos a los agentes inductores de estrés de retículo muestran una resistencia selectiva de las diferentes mutantes, pues  $\Delta ire1$  se observa más sensible a los agentes que  $\Delta hac1$ . Así mismo, entre los agentes también se observan diferencias en la respuesta dado que la Tm indujo fenotipos más sensibles que la 2-DG y el DTT.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La UPR es un mecanismo regulatorio para un desarrollo celular adecuado, así como de respuesta a estímulos ambientales adversos que se encuentra muy conservada en organismos eucariontes. En el humano, la acumulación de proteínas mal plegadas se ha asociado con la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o Parkinson (Katayama *et al.*, 1999, 2001; Nishitoh *et al.*, 2002). Por lo tanto, el estudio de ésta vía en modelos como *K. lactis*, que ha mostrado diferencias en otras respuestas investigadas en el laboratorio (Kawasaki *et al.*, 2008) además de las concernientes a este trabajo, nos puede ayudar a revelar detalles del proceso de evolución y regulación de la ruta resultando con posibles implicaciones médicas.

#### 5. OBJETIVO

Conocer la vía UPR en *K. lactis*, específicamente el procesamiento del mensajero de *HAC1* y su actividad como factor transcripcional.

#### 6. HIPÓTESIS

Con base en estudios previos de la UPR se propone que en *K. lactis*:

- 1) las mutantes  $\Delta ire1$  y  $\Delta hac1$  son sensibles a estrés de retículo endoplásmico y axótrofias para inositol.
- 2) el RNAm de *HAC1* tiene un procesamiento de splicing atípico inducido por agentes causantes de estrés de retículo.
- 3) *KAR2* es regulado por Hac1p mediante su unión a una secuencia consenso

## 7. MÉTODOS

### 7.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Para el mantenimiento y propagación de todos los plásmidos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *supE44*  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsaR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*

De *K. lactis* se utilizó la cepa MD 2/1 (*Mata*, *argA*, *lysA*, *uraA*) para generar las mutantes y para los experimentos de expresión y respuesta a estrés de retículo.

De *S. cerevisiae* se utilizó la cepa W303-A (*MATa*, *ade1*, *ura3*, *his3*, *leu2*, *trp1*) como control en las pruebas de auxotrofia para inositol.

Se utilizó medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina para crecer las bacterias recombinantes a 37 °C.

Los medios utilizados para levadura fueron:

- a) Medio rico YPD que consiste en 1% extracto de levadura, 2% bacto peptona y 2% de glucosa.
- b) Medio mínimo SD que consiste en 0.67% base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) y 2% glucosa. Se suplementó con 50  $\mu$ g/mL de todos los aminoácidos con excepción de uracilo. Solo para *S. cerevisiae* se utilizó el medio con todos los aminoácidos.

Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pGEMT<sup>®</sup>easy (Promega<sup>®</sup>), y en el plásmido YEepKD352 para la expresión de construcciones.

### 7.2. Pruebas de sensibilidad

Este experimento probó la sensibilidad de las cepas silvestre, la *Aire1* y *Δhac1* a agentes que inducen estrés de retículo endoplásmico por goteos de cultivos celulares a una DO<sub>600nm</sub> de 1.0 con 5 diluciones sucesivas 1:10 empleando YPD con los siguientes compuestos: 50 mM de 2-desoxi-D-glucosa y 50  $\eta$ g/mL de tunicamicina. Para las pruebas en medio mínimo sin uracilo y sin inositol, se utilizó un “stock” de vitaminas al 0.1% sin inositol, elementos traza (0.1%), sales (2%), aminoácidos sin uracilo (8%), glucosa (2%), sulfato de amonio (0.5%) y agar (2.5%). Los mismos medios pero con uracilo sirvieron para las pruebas con *S. cerevisiae*.

### **7.3. Localización del intrón de *HAC1***

#### **7.3.1. Northern blot**

Se realizó una hibridación tipo Northern blot con RNA total extraído por el método de fenol ácido caliente (Collart y Oliviero, 1993) de células silvestres tras su incubación con 20 mM de 2-desoxi-D-glucosa en los tiempos 0 min., 30 min., 60 min. y 180 min. El gel de agarosa al 1% utilizado contuvo MOPS 10X (MOPS 200M, acetato de sodio 50mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10mM, pH 7.0) y formaldehído. Se utilizó como sonda con el gen completo de *HAC1* (1149 pb) marcado con [ $\alpha^{32}$ P] dCTP. La sonda fue marcada con Rediprime™ II DNA labeling system (GE Healthcare®). La hibridación se llevo a cabo durante toda la noche a 55°C con tres lavados posteriores de SSC 1X (NaCl 0.15M, citrato de sodio 0.015M) con SDS al 0.5% a 65°C durante 15 min.

#### **7.3.2. RT-PCR y secuenciación**

Para el RT-PCR del RNA total extraído para el Northern blot al minuto 180', primero se hizo el cDNA con la enzima Superscript II (Invitrogen™) según las instrucciones del proveedor y con 2  $\mu$ L de este cDNA otro PCR con *Taq* DNA polimerasa recombinante. Los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio y sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del I. F. C. fueron: 5'AACAGCGTGAGTGATATTCC 3' del +13 al +32 y 5' AACTTCATGAGAGGCCTC 3' del +1175 al +1192. Las condiciones del PCR para la *Taq* DNA polimerasa fueron: desnaturalización 94 °C por 2 mins, 94 °C por 30 segs, 50 °C por 45 segs y 70 °C por 1 min, esto por 40 ciclos. La extensión final se llevó a cabo a 70 °C por 10 mins. Los productos puros y clonados en el vector pGEM®Teasy se secuenciaron en ambas direcciones en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

#### **7.3.3. Predicción de la estructura del RNAm**

Mediante el programa RNAfold desarrollado en el Instituto de Química Teórica de la Universidad de Vienna, Austria, se predijo la estructura que pudiera adquirir la secuencia del intrón de *HAC1* de *K. lactis*. Éste programa utiliza tres algoritmos de programación dinámica: el algoritmo de menor energía libre de Zuker y Stiegler (1981) que revela una única estructura óptima, el algoritmo de función de partición de Mc Caskill (1990) que calcula la probabilidad de apareamiento de bases en un esquema termodinámico, y el



algoritmo de plegamiento subóptimo de Wuchty *et al.* (1999) que genera todas las estructuras subóptimas en un rango de energía dado de la energía óptima. De esta manera, la región del +751 al +1150 que contiene al intrón, más 54 pb del primer exón y 48 pb del segundo exón, se utilizó para la predicción de la estructura secundaria del intrón en el RNAfold con los parámetros antes detallados.

#### **7.4. Construcciones de segmentos de promotor de *KAR2* con GFP**

Al buscar la secuencia de *KAR2* haciendo una búsqueda BLAST en la base de datos Génolevures Project II (<http://www.genolevures.org/elt/KLLA/>) se localizó el ORF KLLA0D09559g que tiene una identidad del 77% con *KAR2* de *S. cerevisiae* (YJL034W). Habiendo 800 pb arriba del ATG inicial como posible promotor de *KAR2* fueron diseñados los oligos: 5' tctagaCACATAACTTCAA 3' del -730 al -712 con el sitio *Xba*I y 5' ggatccgggtaccATAATGATCTT 3' del -17 al +8 que contiene los sitios de restricción *Bam*HI, *Sma*I, *Kpn*I. Las condiciones del PCR fueron con 4 mM de MgCl<sub>2</sub>: desnaturalización a 94 °C por 2 mins; 30 ciclos de 94 °C por 45 segs, 55 °C por 45 segs y 72 °C por 1 min, y por último, una extensión final de 10 mins a 72 °C. Se clonó en el vector para PCR's pGEM<sup>®</sup>Teasy.

##### **7.4.1. Construcción YEpKD1-KAR\_730-GFP**

Tras una doble digestión *Xba*I/*Bam*HI al pGEM-Kar2 para liberar el fragmento de 800 pb correspondiente al promotor de *KAR2* y al vector de expresión para levadura YEpKD1 desfosforilado se ligaron estos fragmentos cohesivos para transformar con esta construcción a *E. coli* con el método de choque térmico. La comprobación de la construcción deseada (YEpKD1-Kar2) fue por medio de digestiones testigo. Se cortaron ambos sitios *Bam*HI del plásmido YEpKDGal-sGFP para obtener el gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*) dando un fragmento aproximado de 750 pb y ligaron a la construcción YEpKD1-Kar2 previamente digerida con *Bam*HI (+12). La comprobación de la dirección del gen fue por medio de restricción (Fig. 11).

##### **7.4.2. Construcción YEpKD1-KAR\_479-GFP**

Se hicieron digestiones por separado de la construcción YEpKD1-KAR\_730-GFP con *Xba*I y *Bst*XI. Se rellenaron los extremos y ligaron para posteriormente, transformar a *E.*

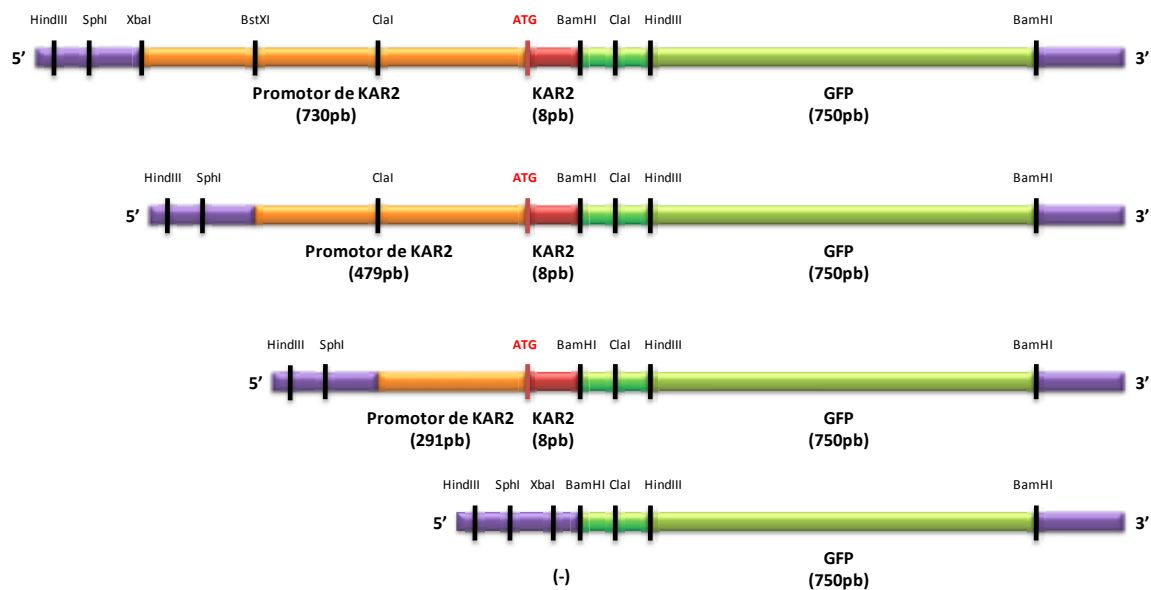
*coli*. La comprobación de la construcción deseada fue por medio de digestiones testigo (Fig. 11).

### 7.4.3. Construcción YEpKD1-KAR\_281-GFP

Esta construcción partió de una hebra previamente (YEpKD1-Kar2) descrita en el inciso 7.4.1 de esta tesis. Tras una doble digestión *XbaI/ClaI*, se rellenaron los extremos y ligaron para transformar a *E. coli*. La comprobación fue por medio de digestiones testigo (YEpKD1-KAR\_281). Se cortaron ambos sitios *BamHI* de l plásmido YEpKDGal-sGFP para obtener el gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*) dando un fragmento aproximado de 750 pb y ligaron a la construcción YEpKD1-KAR\_281 previamente digerida con *BamHI* (+12). La comprobación de la dirección de l gen fue por medio de restricción (Fig. 11).

### 7.4.4. Construcción YEpKD1-GFP

Tanto el vector YEpKD1 como el inserto del plásmido YEpKDGal-sGFP, el gen *GFP*, se cortaron con la enzima *BamHI* y ligaron. La comprobación de la dirección del gen fue por medio de restricción a varias colonias seleccionadas.



**Fig. 11** Esquema de las Construcciones del Promotor de *KAR2* con *GFP*. De arriba a abajo, construcción con el promotor de *KAR2* completo (730 pb) en marco con la proteína verde fluorescente (*GFP*); primera deleción dejando 479 pb del promotor; segunda deleción dejando 291 pb del promotor; construcción sin promotor, solo el gen *GFP* insertado en el mismo sitio y dirección que las demás construcciones (detalles, ver texto).

### **7.5. Citometría de flujo**

Cultivos de toda la noche en SD-URA líquido de la cepa silvestre con las construcciones del promotor de *KAR2* con *GFP* se ajustaron a una  $DO_{600nm}$  de 0.3 para inducir el estrés con 30 mM de 2-desoxi-D-glucosa. La medición de 20,000 eventos para saber la cantidad de células fluorescentes por GFP sin inducción, al tiempo 0 min., 15 min., 30 min. y 60 min. se llevó a cabo con el equipo Becton Dickinson® modelo FACSCalibur™ en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

### **7.6. Microscopía confocal**

Cultivos de toda la noche en SD-URA líquido de la cepa silvestre con las construcciones del promotor de *KAR2* con *GFP* y además de la silvestre en YPD se ajustaron a  $DO_{600nm}$  0.3 para inducir el estrés con 20 mM de 2-desoxi-D-glucosa. Tres muestras de cada una, la primera sin inducción, la segunda con 30 min. y la tercera con 60 min. fueron registradas de dos a tres campos cada una. Las observaciones de microscopía confocal fueron en el microscopio Olympus FluoView™ modelo FV1000 en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular.

### **7.7. Western blot de construcciones de *KAR2***

Cultivos de toda la noche en SD-URA líquido de la cepa silvestre con las construcciones del promotor de *KAR2* con *GFP* y además de la silvestre en YPD se ajustaron a una  $DO_{600nm}$  de 0.3 para inducir el estrés con 20 mM de 2-desoxi-D-glucosa por 60 min. Se extrajo proteína total mediante la incubación de las células con 50  $\mu$ L buffer de lisis (HEPES 50mM, EDTA 3mM, DTT 1mM, polivinilpirrolidona 0.6%,  $MgCl_2$  0.1mM a pH 7.2) poniéndose a hervir por 10 min., añadiéndoles azul de bromofenol como colorante. Se cargaron 20  $\mu$ L de muestra en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) al 10% y corrieron por 1h 30 min. a 200 V. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para observar la cantidad de proteína.

Para el Western blot, dos membranas Millipore fueron activadas en metanol, lavadas y equilibradas en buffer de transferencia al igual que el gel y dos piezas de papel filtro y dos fibras. Se colocó para cada transferencia: una fibra, un papel filtro, un gel, una membrana,

otro papel filtro y la otra fibra en un cassette. Así, en una cámara de electrotransferencia junto con un “cooler” corrieron las muestras a 100 V por 1 hr. Una de las membranas se tiñó con rojo de Ponceau al 0.1% en 5% de ácido acético (Sigma®) para observar la eficiencia de transferencia.

La segunda membrana, tras estar con solución de bloqueo conteniendo PBS 1%, BSA 1% y 0.1% Tween20 por 1 hr. a 37 °C con movimiento constante y lavar, se incubó con anti-GFP de conejo (Invitrogen®) por 1hr. El anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Zymed®) fue el anticuerpo secundario. Las membranas expuestas a placas de rayos X Kodak® por 30 seg. revelaron bandas por quimioluminiscencia utilizando sustrato de Pierce™.

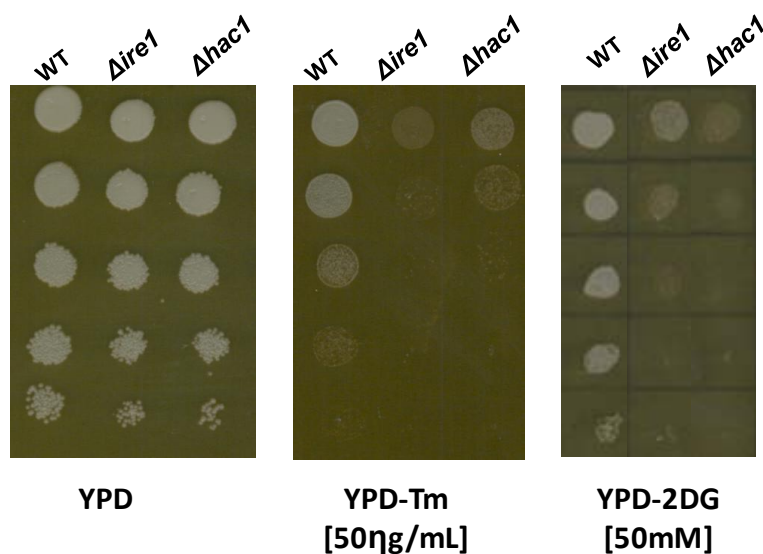
## 8. RESULTADOS

### 8.1. Sensibilidad de la cepa silvestre, *Δire1* y *Δhac1* a agentes que inducen estrés de retículo y auxotrofia para inositol

Estudios previos en el laboratorio manejaron como características de las mutantes de los genes *IRE1* y *HAC1* en levadura la sensibilidad a Tm y 2-DG, ambos agentes inhibidores de la glicosilación de proteínas, así como auxótrofia para inositol.

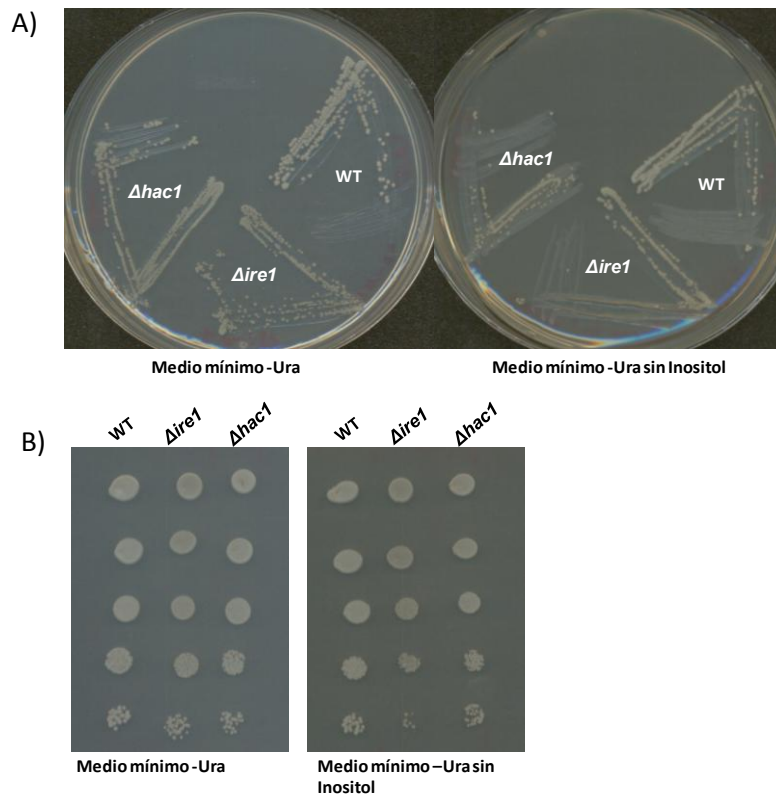
Las colonias mutantes de *IRE1* y *HAC1* seleccionadas se probaron con agentes que causan estrés de retículo endoplásmico inhibiendo la glicosilación de proteínas: tunicamicina (Tm) y 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) para confirmar el fenotipo previamente encontrado.

Con goteos de cada mutante en cajas de YPD, con Tm (50  $\eta$ g/mL) y con 2-DG (50 mM) con 5 diluciones de células en serie de 1:10 y la WT como control se observó un fenotipo de sensibilidad fuerte para la *Δire1*. Por otra parte, *Δhac1* presenta fenotipo de sensibilidad, pero no tan severo como *Δire1*.



**Fig. 13 Fenotipos de las Mutantes de *IRE1* y *HAC1* en Diferentes Medios.** Los goteos muestran primero, el crecimiento de la WT y las mutantes *IRE1* y *HAC1* en medio rico (YPD) y posteriormente se muestran placas con agentes inhibidores de la N-glicosilación, 50 mM de 2-desoxi-D-glucosa, 50  $\eta$ g/mL de tunicamicina, mostrando la sensibilidad de ambas mutantes a estos agentes.

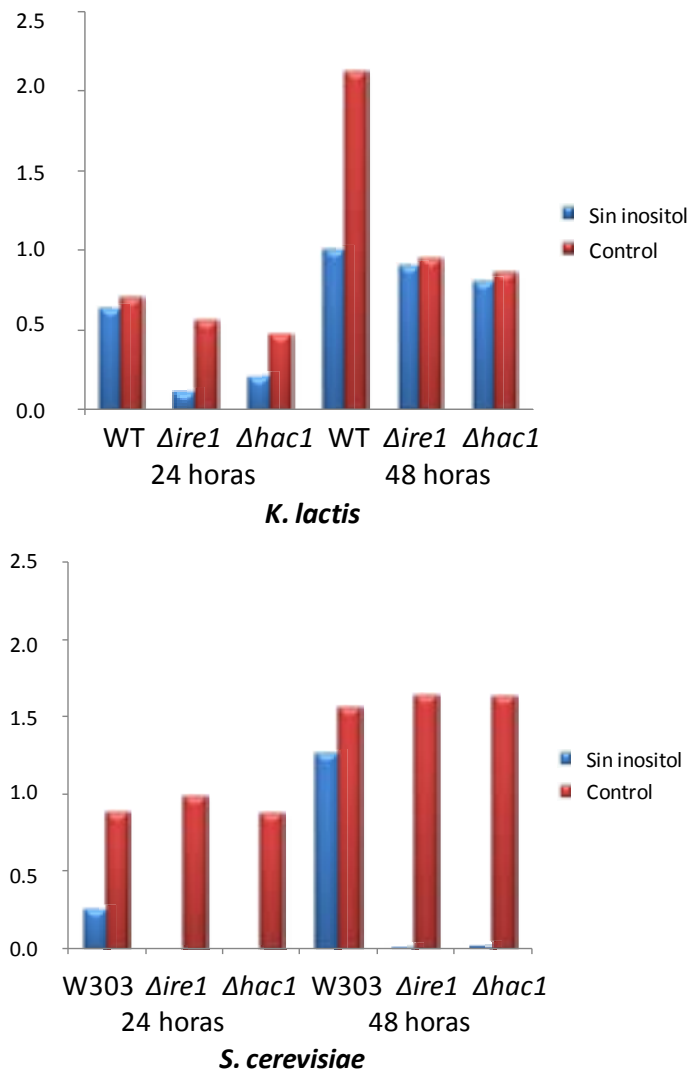
La *Δire1* y *Δhac1* también se probaron en medio mínimo sin inositol para observar la auxotrofia para inositol con tres métodos: estriar las cepas para observar algún fenotipo a nivel de colonia (Fig. 14A), realizar goteos (Fig. 14B) y medir el crecimiento en medio líquido por 24 hrs y 48 hrs (Fig. 15) teniendo como controles la cepa silvestre transformada con un vector que contenía el gen URA3 y la cepa silvestre W303 de *S. cerevisiae* y sus mutantes *IRE1* y *HAC1*. Para *S. cerevisiae* se empleó medio mínimo -Ura +Ura y medio mínimo -Ura +Ura sin inositol.



**Fig. 14 Fenotipo de las Mutantes de *IRE1* y *HAC1* en Medio Mínimo sin Inositol.** A) Se muestran colonias de las cepas WT, *Δire1* y *Δhac1* mostrando un crecimiento normal de la colonia pero en número más reducido en medio sin inositol. B) Goteos de diluciones sucesivas de las cepas WT, *Δire1* y *Δhac1* mostrando ligera sensibilidad al medio sin inositol.

En las cajas con las cepas estriadas hubo un crecimiento normal en la forma y tamaño de las colonias en medio sin inositol; sin embargo, el número de colonias disminuyó drásticamente para la *Δire1* y un poco para la *Δhac1* en este medio. En los goteos sólo hubo una ligera sensibilidad en las últimas diluciones de la *Δire1* más no de la *Δhac1* en medio sin inositol.

En la prueba en medio mínimo líquido sin inositol, la cepa silvestre y las mutantes *IRE1* y *HAC1* de *K. lactis* (MD2/1) a las 24 horas han disminuido su crecimiento en un 82.89% y 67.32% respectivamente en comparación con el control y las cepas mutantes de *S. cerevisiae* (W303) resultaron ser auxótrofas para inositol como ya se ha reportado (Nikawa y Yamashita, 1992). Sin embargo, a las 48 horas las cepas mutantes de *K. lactis* se recuperaron hasta llegar a una densidad óptica similar a las de los experimentos control, con una diferencia de 19% para *Δire1* y 19.29% para *Δhac1* con respecto al control, mostrado en la gráfica 1 siendo ésta la figura más significativa.

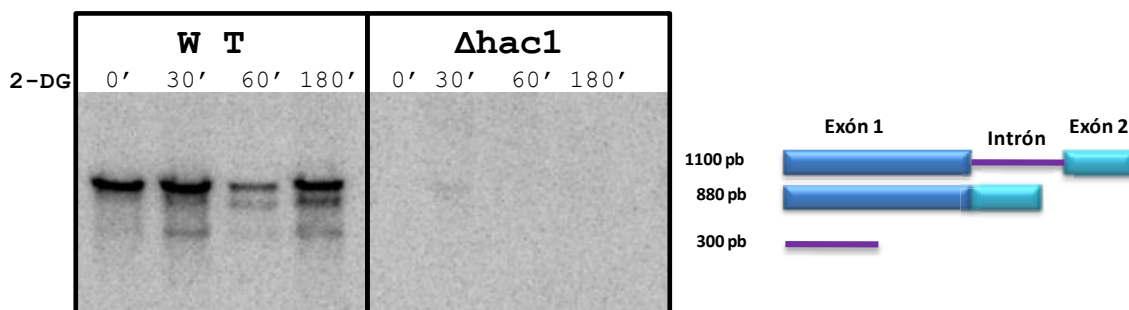


**Gráfica 1. Crecimiento en Medio Sin Inositol.** La cepa WT, *Δire1* y *Δhac1* se crecieron a 30C en medio mínimo líquido sin inositol. Se tomaron muestras a las 24 horas de crecimiento y a las 48 horas para determinar su densidad óptica. El crecimiento de la población experimental a las 24 horas se vio afectado (más no inhibido, como las cepas mutantes de *S. cerevisiae*) por la ausencia de inositol en el medio. Pero éste se recupera a las 48 horas en las cepas mutantes, por lo tanto, no muestran auxotrofia para inositol. Como control, se utilizó la cepa W303 WT, *Δire1* y *Δhac1* donde se observa la auxotrofia para inositol, como lo ya reportado por Nikawa y Yamashita (1992).

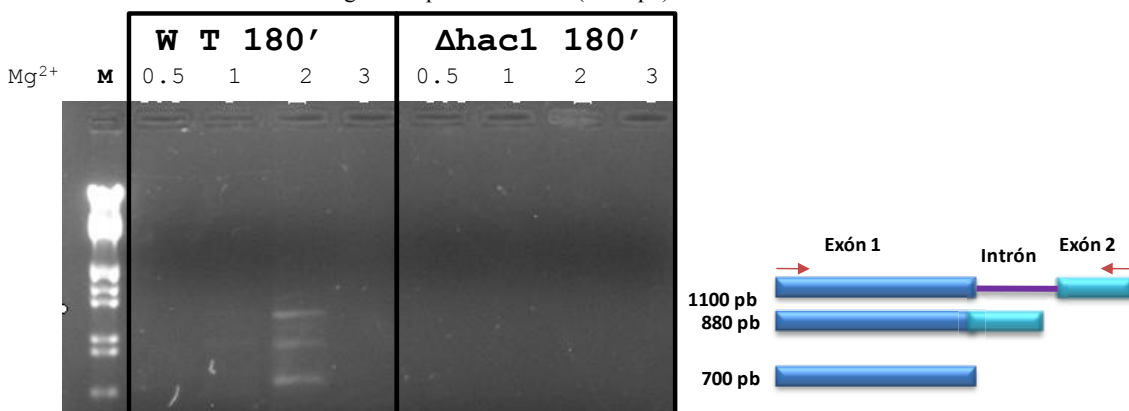
Estos resultados nos indican que las cepas *Aire1* y *Δhac1* no son auxótrofas para inositol, por lo que la vía de síntesis de inositol debe de estar sucediendo de otra forma.

## 8.2. Procesamiento del RNAm de *HAC1*

Aunque ya fue observado el procesamiento del mensajero de *HAC1* para *K. lactis* en el laboratorio, no se había logrado amplificar para confirmar, por lo que hubo que hacer otro Northern blot de extracciones de RNA total de cepa silvestre a diferentes tiempos (0', 30', 60', 180') tras la inducción con 2-DG; como control se utilizó a *Δhac1*. Esta vez hibridó con 1149 pb desde el ATG inicial de *HAC1* que probablemente tenga el intrón. Hubo la misma observación del procesamiento en todos los tiempo a excepción del 0'. Esta vez, con el cambio de sonda, también se observó una banda más pequeña (300 pb a prox.) que probablemente corresponde al intrón procesado (Fig. 15).



**Fig. 15 Northern blot del RNAm de *HAC1*.** A En la hibridación tipo Northern se evidencia el procesamiento del mensajero de *HAC1* tras la incubación de las células con 20 mM de 2-DG en los tiempos 0', 30', 60', y 180' y el intrón procesado. Como sonda se utilizó el gen completo de *HAC1* (1148 pb).



**Fig. 16 RT-PCR del mensajero de *HAC1*.** RT-PCR a partir de RNA de células tratadas 180' con 2-DG. Se amplificaron tres bandas con un peso aproximado de 1100 pb, 880 pb y 700 pb. Éstas son: el mensajero completo (con intrón; 1100 pb), el mensajero procesado (sin intrón; 880 pb) y una amplificación del primer exón (700 pb) resultado de un alineamiento inespecífico de los oligos. Los esquemas de éstos aparecen a la derecha. Las flechas rojas señalan los oligos.



Para determinar los sitios de procesamiento del mensajero y la naturaleza de la tercera banda, tras una reacción en cadena con la transcriptasa reversa (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos para *HACI* (ver métodos), se clonaron los productos en el vector pGEMT<sup>®</sup>easy y secuenciaron todas las bandas. El resultado fue que la banda de 1100 pb corresponde al RNA sin procesar, la banda de 880 pb es el mensajero procesado y la banda de 700 pb corresponde a una amplificación del primer exón (Fig. 16). Este pudo amplificarse tal vez debido a un alineamiento inespecífico de los oligos.

### 8.3. Análisis de la secuencia

El gen *HACI* en *K. lactis* (1149 nucleótidos), compuesto por dos exones, el primero de 805 nucleótidos y el segundo de 47 nucleótidos del +1103 al +1149, contiene un intrón de 297 nucleótidos del +806 al +1102. El corte se realiza siempre después de una guanina, y en el caso de *K. lactis*, en la secuencia ATCCAG↓CAGNGAT del lado 5' y TGCCCG↓AAGCGCA del lado 3' (Fig. 17).

La traducción del mensajero procesado genera un péptido de 284 aminoácidos que corresponde al factor transcripcional Hac1p (Fig. 18). El mensajero no procesado que llega a traducirse genera un péptido de 273 aminoácidos por una zona de 5 tripletes que quedan dentro del marco de lectura. Estudios reportan que en *S. cerevisiae* esta proteína no produce una respuesta tan eficiente como la versión del mensajero procesado (Kawahara *et al*, 1997).

```

-100 atcttccacc ctccagagaca aaataacttg tattgggata aacaacctgt
-50 gagacgggta gagactgata aataagaagc taagatatta caaattcatt
  1  ATGACAGGAA AAAACAGCGT GAGTGATATT CCAGTGAAC TTAAGCCCAC
 51  ATTACCACCA AGGAAACGGG CAAAGACTCA GGAAGAGAAG GAGCAGAGAA
101  GGATCGAGAG AATTTTGCCT AACCGTAGGG CTGCACATCA ATCTCGTGAG
151  AAGAAACGTT TGCATGTGCA ACGGTTGGAA GAGAAATGTC ATCTATTGGA
201  AGGCATTTTG AAAATGGTTG ATTTGGATAT TTTGAGTGAG AATAACCGGA
251  AGCTTAGCGG GATGGTTGAA CAATGGAGAG AAATGCAAGT CAGTGATTCT
301  GGAAGTATTT CTTCTCATGA CAGTAACACC GGGATGCTAG ACTCTCCAGA
351  GAGTCTAACG TCTAGTCCTG ATAAGAAGGA CCATTATTCT CATTCAAGTC
401  ATTCGACATC AATAAGTAGT TCTTCATCCT CTTCTTCTCC TTCGAATCTA
451  CCGCATGGAA TGGTAACTGA CAATGGTATG CTTGACGAAG ATAACAATTC
501  TTTGAATTAC ATCTTGGGAC AACAGAATTA CCAACTATCA TCTACTCCTG
551  TGGTAAAGCT CGAAGAAGAC CATTTCGATG TTTTAGAAAA TAATGGCGAT
601  GCTGATCTAA ACGATGTGGG AATTTCTTTC ATCGCTGAAG ATGGTACCAA
651  CAGCGACAAC AAAAATATAG ATATGAGAAA CCAGGAAACT GGCGAAGGTT
701  GGAACCTCTT GTTGACGGTA CCTCCTGAAC TAAACTCCGA CTTGTCTGAA
751  CTTGAACCAT CAGATATAAT AAGTCCAATC GGCCTTGACA CATGGCGCAA
801  TCCAGcagtg attgtaacat gaaaagtata cgatactcag catataccag
851  gagacagaca cttatgcgaa agaagagaag agacatgac accacgttgt
901  atccagtcaa taatcagtca aatctagccg tctcacagct aatacaagct
951  cctttattcc tctctcattt ctcttcttcc ccagtttgcc cttttcaagg
1001 gtcaaacacc tgtgtgtgtg tttttgcaa atgtaagag ataatatcac
1051 aagcgtgatg tctttacatt gtatatgcga gtatttttta cttctctgcc
1101 cgAAGCGCAG TCAAGTATGT TAGCCGTGGA CTTTGACGAT CTTATGGATt
1151 agaccagaca ctccagaggt gacggaggcc tctcatgaag tt

```

**Fig. 17 Mapeo del intrón de *HACI*.** En mayúsculas se resaltan los nucleótidos codificantes. Se marcan de rosa la secuencia del intrón de 297 pb y de amarillo los nucleótidos en donde se anclan los oligos. Las zonas subrayadas corresponden a la secuencia UTR 5' y parte del intrón que posiblemente se aparean promoviendo la atenuación de la traducción del mensajero (AnnHyb 4.942).

```

  1  MTGKNSVSDI FVNFKPTLPP RKRAKTQEEK EQRRIERILR NRRAHQSR
 51  KKRLHVQRLE EKCHLLEGIL KMVDLDILSE NNAKLSGMVE QWREMQVSDS
101  GSISSHDSNT GMLDSPESLT SSPDKKDHYSS HSSHSTSISS SSSSSPSNL
151  PHGMVTDNGM LDEDNNSLNY ILGQQNYQLS STPVVKLEED HSMLLENNGD
201  ADLNDVGISF IAEDGTNSDN KNIDMRNQET GEGWNLLLTV PPELNSDLSE
251  LEPSDIISPI GLDTWRNPEA QSSMLAVDFD DLMD

```

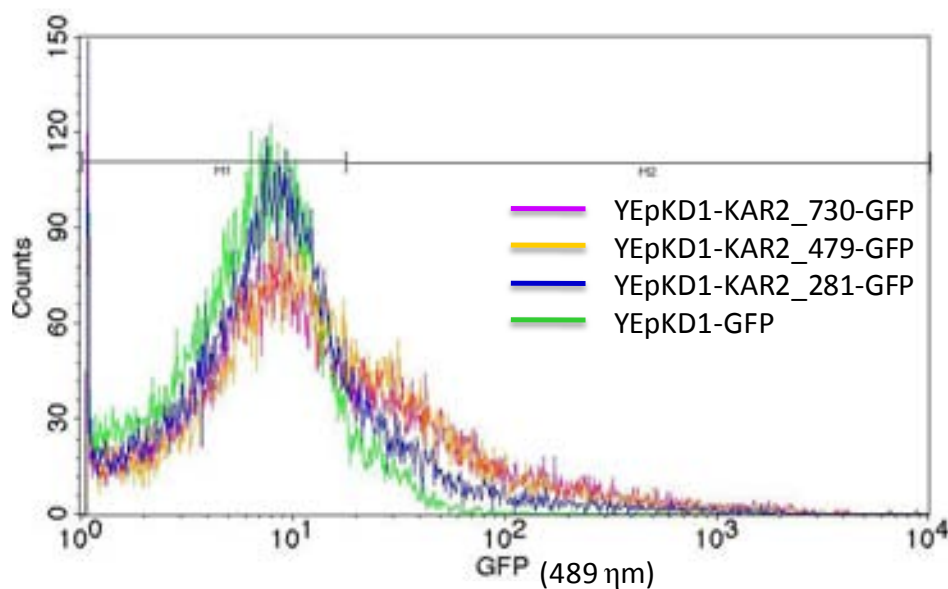
**Fig. 18 Secuencia de aminoácidos a partir del RNAm procesado de *HACI* de *K. lactis*.** En verde se resalta el dominio de unión a DNA, en amarillo la región del “zipper” de leucinas y en rojo la prolina que se produce con el “splicing” del mensajero (tblastn; NCBI).

#### 8.4. Expresión de *KAR2* en respuesta a 2-desoxi-D-glucosa

Para definir la región del promotor que responde al estrés de retículo endoplásmico, utilizamos el promotor de *KAR2* ya que codifica para la chaperona BiP encargada del

plegamiento de las proteínas en el retículo. Con construcciones con diferentes deleciones de la región promotora de *KAR2* más la fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) se midió la fluorescencia de ésta en tres pruebas para medir el efecto de las deleciones en la expresión de *KAR2*.

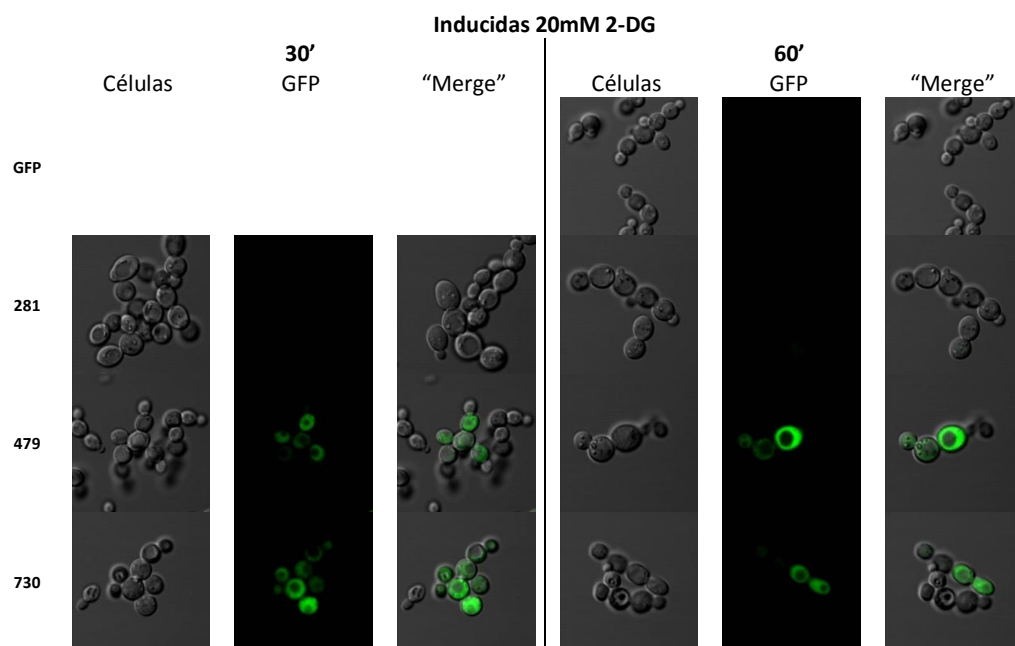
La citometría de flujo nos permitió cuantificar el número de células fluorescentes en respuesta a 2-DG. Para ello, con cultivos de transformantes de las diferentes construcciones y de la cepa silvestre en una  $DO_{600nm}$  de 0.3 con 30 mM de 2-DG se hizo el conteo de células de la construcción control YE pKD1-GFP y de la cepa silvestre para ajustar la fluorescencia basal de las células. Luego de otro conteo de las otras construcciones a l tiempo 0' y a los 15 y 30 minutos de inducción vimos un aumento gradual de células fluorescentes conforme pasó el tiempo para las construcciones YE pKD1-Kar\_730-GFP y YE pKD1-Kar\_479-GFP, y muy poco o nada de aumento para la construcción YE pKD1-Kar\_281-GFP (Fig. 19). Esto arrojó como resultado la posible región donde se encuentre la zona regulatoria del promotor de *KAR2* o parte de ella.



**Fig. 19 Histograma de la citometría de flujo.** Se transformaron células WT con las 4 construcciones del promotor de *KAR2* con *GFP*. Se ajustó el cultivo a  $DO_{600nm}$  0.3 para incubar con 30 mM de 2-DG y realizar el conteo de tiempo células fluorescentes en longitud de onda de GFP a los 0', 15', 30' y 60'. La zona roja se genera por el sobrelape de las líneas morada y amarilla de las construcciones con el promotor completo y la primera deleción, respectivamente.

Con microscopía confocal comprobamos los datos anteriores observando la expresión de GFP en células individuales en respuesta a la 2-DG. Para ello, con transformantes de 1 día

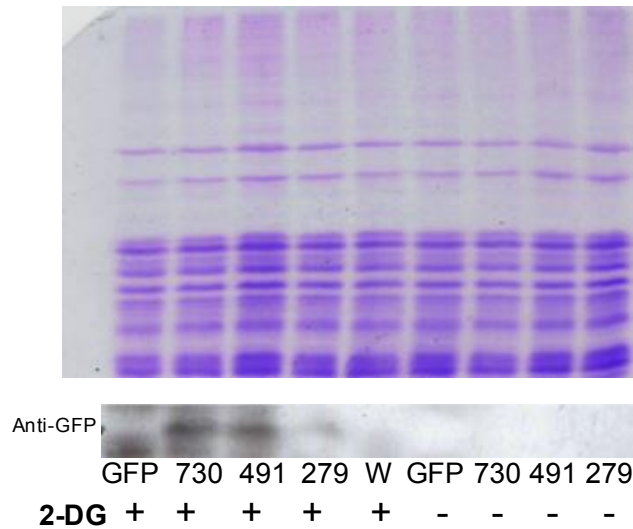
con las cuatro construcciones cada una (YEpKD1-Kar\_730-GFP, YEpKD1-Kar\_479-GFP, YEpKD1-KAR\_281-GFP y YEpKD1-GFP) y de la cepa silvestre en cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 0.3 se les indujo estrés con 20 mM de 2-DG por 30 min. y 60 min., más un control sin estrés. De cada montaje fueron registrados dos o tres campos diferentes. No se observó fluorescencia tanto en la cepa silvestre como en la construcción YEpKD1-GFP, mientras que en las construcciones YEpKD1-Kar\_730-GFP y YEpKD1-Kar\_479-GFP hubo células intensamente fluorescentes. La construcción YEpKD1-KAR\_281-GFP mostró pocas células con limitada fluorescencia (Fig. 20).



**Fig. 20 Micrografías de la Respuesta del Promotor de *KAR2*.** Células WT transformadas con las 4 construcciones del promotor de *KAR2* y *GFP* ajustadas a  $DO_{600nm}$  0.3 vistas en microscopía confocal a los 30' y 60' de la inducción con 20 mM de 2-desoxi-D-glucosa. Se muestran 3 imágenes, primero las células a simple vista, segundo la toma de fluorescencia y tercero, el sobre lapte de las dos anteriores. La fluorescencia solo se presentó en la construcción completa de 730 pb (control positivo), delimitándose en la región del -479 al -281 por la pérdida de la fluorescencia en la construcción con solo 281 pb. La construcción sin promotor (solo GFP) se utilizó como control negativo (Microscopio Olympus Fluoview™ FV1000 y Viewer 1.7).

La hibridación de la proteína GFP con su anticuerpo específico, nos confirmó la producción y presencia de la proteína en células expuestas a 2-DG. Esto fue hecho con una hibridación tipo Western blot a las proteínas extraídas de levaduras silvestres transformadas con las cuatro construcciones del promotor de *KAR2* con GFP inducidas con 20 mM de 2-DG y otro juego de levaduras control (sin estrés). El control de carga se hizo con la proteína teñida con azul de Coomassie, teniendo aparte otra membrana incubada con anti-GFP. Las bandas observadas mediante quimioluminiscencia revelaron que solo hubo producción de

proteína GFP (27 kDa) en las levaduras con la construcción YE pKD1-Kar\_730-GFP y YE pKD1-Kar\_479-GFP (Fig. 21).



**Fig. 21 Expresión de la proteína GFP de las diferentes regiones del promotor de *KAR2*.** Las transformantes WT con las cuatro construcciones del promotor de *KAR2* fueron crecidas a  $DO_{600nm}$  0.1 a 30 °C en medio SD-URA. A  $DO_{600nm}$  0.3 se les agregó 20 mM de 2-DG y se dejaron crecer a 30 °C por 1 hr. Posteriormente las células fueron colectadas y lisadas. Las proteínas fueron fraccionadas por SDS-PAGE 10%. La proteína GFP fue detectada por subsecuente hibridación tipo Western con anti-GFP. Después del tratamiento con los agentes quimioluminiscentes, la membrana fue expuesta a placas fotográficas por 30 seg.

Los resultados anteriores nos marcaron la zona del promotor donde posiblemente se encuentre la secuencia reguladora de *KAR2* que responden a estrés de retículo, y que incluye del -491 al -280 (211 pb) del promotor.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Sensibilidad de las mutantes *Aire1* y *Δ hac1* a estrés de retículo y auxotrofia para inositol

De la levadura *S. cerevisiae* hay reportes de la sensibilidad de las mutantes *IRE1* y *HAC1* a diversos agentes causantes de estrés de retículo en doplásmico, tales como DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, 2-desoxi-D-glucosa y tunicamicina. En *K. lactis* se demostró que la ausencia de los genes *HAC1* e *IRE1* afecta el crecimiento de ésta en [50 mM] 2-desoxi-D-glucosa y [50  $\mu$ g/ml] de tunicamicina, agentes que provocan estrés de retículo inhibiendo la N-glicosilación, así como a 30 mM de DTT, agente que reduce los enlaces disulfuro de proteínas. También hubo ligeras diferencias entre *Aire1* y *Δ hac1*, ya que una mutante de

*IRE1* es más sensible que la de *HAC1*. Esto puede deberse a la existencia de algún otro sustrato de Ire1p no identificado que pueda auxiliar en la respuesta.

La auxotrofia para inositol reportada para  $\Delta ire1$  y  $\Delta hac1$  de *S. cerevisiae* (Nikawa y Yamashita, 1992) se encontró ausente para *K. lactis*. A las 24 horas de crecimiento en medio mínimo sin inositol, las cepas mutantes de *K. lactis* habían disminuido su crecimiento en comparación con el control. Sin embargo, a las 48 horas se recuperaron hasta llegar a una densidad óptica similar a las de los experimentos control. Esto nos indicó que *IRE1* y *HAC1* de *K. lactis*, aunque pudieran participar en la vía de síntesis de inositol, no son indispensables. En la levadura *S. cerevisiae* donde fue descrita la auxotrofia de *IRE1* para inositol, se pensó esta cinasa que pudiera jugar un rol activando a otras enzimas (por su actividad de cinasa o por liberación de calcio) que regularan la transcripción de genes de síntesis de inositol, o bien, que ésta tuviera alguna relación directa con un factor transcripcional que regulara estos mismos genes (Nikawa y Yamashita, 1992). Pero hasta ahora el único sustrato para Ire1p que se ha reportado es el RNAm de *HAC1*, traduciéndose a un factor transcripcional que sí parece tener sitio de unión a los promotores de los genes para la síntesis de inositol. Sin embargo, en hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, se mostró ausente la auxotrofia para inositol en la mutante de *HAC1* indicando de este factor no es requerido para la vía de síntesis de inositol (Richie *et al.*, 2009). Igualmente en *K. lactis* encontramos que dado que ni  $\Delta hac1$  ni  $\Delta ire1$  parecen mostrar dicha auxotrofia, la realización de la vía de síntesis de inositol debe ser mediante elementos que desconocemos y que puedan complementar o sustituir a *HAC1* como activador de transcripción de los genes de síntesis de inositol y a *IRE1* como herramienta regulatoria y activadora de *HAC1*.

## **9.2. Procesamiento del mensajero de *HAC1***

Por estudios en diferentes organismos, parece ser que el procesamiento de *HAC1* y toda la ruta UPR están muy bien conservados en todos los eucariontes. Estudiamos el procesamiento independiente de spliceosoma de *HAC1* pues era importante saber si se encuentra conservado en *K. lactis*.

La hibridación del RNA a diferentes tiempos de inducción de estrés indica que hay un procesamiento de *HAC1* desde los 15 min. y se mantiene. Alineamientos con la secuencia de aminoácidos de Hac1p de *S. cerevisiae* y *Candida albicans* (en ambas ya confirmado el procesamiento; Mori *et al.*, 1996, 2000; Cox y Walter, 1996; González *et al.*, 1999; Kawahara *et al.*, 1997; Sidrauski y Walter, 1997; Wimalasena *et al.*, 2008) mostraron que el intrón contiene un codón de término cinco tripletes después del primer exón. El resto de la secuencia del intrón es no codificante. Con desoxioligonucleótidos y RT-PCR encontramos la secuencia de *HAC1* procesada con el corrimiento de marco de lectura por el corte del intrón de 296 pb entre el +806 y +1102, además de un intermediario que corresponde al primer exón sin ligar (805 pb). Esto nos confirma que hay un procesamiento del mensajero de *HAC1* en respuesta a estrés de retículo como se reporta para *S. cerevisiae* (Cox y Walter, 1996) y su ortólogo *XBPI* en metazoario y mamífero (Shen *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001) entre otros, confirmando también el alto grado de conservación de la ruta. Al secuenciar el fragmento de 800 pb que resultó ser el mensajero procesado, notamos que el corte del intrón se realiza en ATCCAG↓CAGNGAT del lado 5' y en TGCCCG↓AAGCGCA del lado 3', siempre después de una guanina. Estos nucleótidos aledaños a los sitios de splicing se encontraron muy conservados en otros hongos (*Candida albicans* y *S. cerevisiae*) tras el alineamiento de los mensajeros procesados (Fig. 22).

La predicción de la estructura secundaria del intrón indica que puede formar una estructura tallo-asa, para facilitar el anclaje al dominio de endorribonucleasa de Ire1p tal y como ya está reportado para *S. cerevisiae* y también para *XBPI* en mamífero (Kawahara *et al.*, 1998; González *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2001). Como muestra la figura 23A, los cortes señalados con flechas son en la posición +805 para el asa 5' y +1102 para el asa 3'; la línea punteada encierra toda la estructura del intrón. Una vista mas detallada de las bases que componen estas asas (Fig. 23B), nos muestra los cortes con lo que pudimos comparar el grado de conservación entre las asas que se han predicho. La figura 24C muestra un alineamiento de estas regiones y se marca en verde los nucleótidos mejor conservados. Para el asa 5' solo está bien conservado el sitio de corte en las tres especies. En la región 3' hay un grado de conservación más alto pero justo el sitio de corte cambia para *Homo sapiens*.

CLUSTAL Muscle

```

Candida/1-1104      ATGGAGTAACTGTTGATAACCAATACTACTTCCAATATAGATGATTATCTGTTGCT
Saccharomyces/1-717 ATGGAAATGACTGATTTTGA-----
Kluyveromyces/1-852 ATG-----

Candida/1-1104      ACACCAACTTCTTTAATGACAAGTACTACTACATCACCATCAATGTCAACATCAACAAGT
Saccharomyces/1-717 -----ACTAACTAGT
Kluyveromyces/1-852 -----ACAGGA

Candida/1-1104      AGTCATAGCAACACTTTAGATATAGATCCAGCTACTTTTAAATCAACTTTGCCACCTAGG
Saccharomyces/1-717 AATTCGCAATCGAACTTGGCTAT---CCCTACCAACTTCAAGTCGACTCTGCCTCCAAGG
Kluyveromyces/1-852 AAAAACAGCGTGAGT---GATAT---TCCAGTGAACTTTAAGCCACATTACCCCAAGG

Candida/1-1104      AAAAGAGCCAAGACTCAAGAAGAAAAGGAACAAAGAAAGATTGAAAGAAATTTAAGAAAT
Saccharomyces/1-717 AAAAGAGCCAAGACAAAGAGGAAAAGGAACAGCGAAGGATCGAGCGTATTTTGAAGAAC
Kluyveromyces/1-852 AAACGGCAAGACTCAGGAAGAGAAAGGAGCAGAGAAGGATCGAGAGAAATTTTCCGTAAC

Candida/1-1104      AGAAGAGCAGCTCATGCATCTAGAGAAAAGAAAAGAAAACATGTTGAATATTTAGAAAAC
Saccharomyces/1-717 AGAAGAGCTGCTCACCAGAGCAGAGAGAAAAGAACTACATCTGCAGTATCTCGAGAGA
Kluyveromyces/1-852 CGTAGGGCTGCACATCAATCTCGTGAAGAAAAGCTTGCATGTGCAACGGTTGGAAGAG

Candida/1-1104      TATGTTTTAAAATTGGAAACAAATTTAATGAAATGAATAATAATATAATCAAGCATT
Saccharomyces/1-717 AAATGTTCTCTTTTGA---AAATTTACTGAACAGCGTCAAC-----CTT
Kluyveromyces/1-852 AAATGTCATCTATTGGA---AGGCATTTTGAATAATGTTGAT-----TTG

Candida/1-1104      GAATTATAACTAAAGATAATCAGGAG-----TTACTATTGTCTAAACTG
Saccharomyces/1-717 GAAAACTGGCTGACCA-----CGAAG-----ACGGTTGACTTG
Kluyveromyces/1-852 GATATTTTGAGTGAGAATACCGGAAGCTTAGCGGGATGGTTGAACAATGGAGAGAAATG

Candida/1-1104      AAGTTTTAGATGTGTTTCTGATTTAAAAGAACAATTCATTCTAATATGAGTGGTACAA
Saccharomyces/1-717 CAGCC---ACGACGCTTT-----GTTGCTCTCTTGACG---AGTACAG
Kluyveromyces/1-852 CAAGT----CAGTGATTCT-----GGAAGTATTCTTCTCATGACAGTACACCCG

Candida/1-1104      GAAGG-----TTCATAATAAGAAGTCAAATGATGAAGACATAGAAGAAGAAGATGAGG
Saccharomyces/1-717 GGA-----TTC-----CAGAG-----
Kluyveromyces/1-852 GGATGCTAGACTCTC-----CAGAGGCTTAACG

Candida/1-1104      ATGAACACCAAGAAAGAGGTCA--TGTTGAAAAACAGAAATAAAAAGGAAGAACAGT
Saccharomyces/1-717 -----CACGAGGGCGCTT-----CACTGGACACC-AGGGCCAGT
Kluyveromyces/1-852 TCTAGTCTGATAAGAAAGACCATATTTCTCATTCAAGTCATTCGACATCAATAGTAGT

Candida/1-1104      T-----TCTAAAAAAGGAAACTTAATACCAAAACTAAATCTAAAAACA
Saccharomyces/1-717 T-----CGCACTCGTCTGATACGTTAC-----
Kluyveromyces/1-852 TCTTCACTCTTCTTCTCTTCGAATCTACCGCATGGAATGGTAACTG-----

Candida/1-1104      AAAACAAGAAAGTTCCAACAAAATATGACGCTCACCACCATCTTCAGTATCTTCATTA
Saccharomyces/1-717 --ACCTTCACTCTGAAGTGTACAATGGAGCCTGGCAGTTTGTCG-----
Kluyveromyces/1-852 ACAATGGTATGCTTGACGAAGATAACAATTTCTTGAATTACATCTT--GGGCAACAGAA

Candida/1-1104      TCACCAGATGT-TACTAACTTTAGTGGAACTAATACCACCATGTGATC--ACCAATCAA
Saccharomyces/1-717 ---CCAAGAGTATGGCGGATTCGCG-----TCGGACCAAGAGACTTCATG-----
Kluyveromyces/1-852 TTACCAACTAT-CATCTACTCTGTGGTAAAGCTCGAAGAAGACCATTCGATGCTTTTAG

Candida/1-1104      ATAAAAAAGGAGTT--TAATATGATAATATTTTATAAAAAAGAGTTTTCACAATCAC
Saccharomyces/1-717 -----GGAGCTGCAGATGTTAAGA-----CGGAAATGTACCAGAGTCA
Kluyveromyces/1-852 AAAAATAATGGCGATGCTGATCTAAACGATGT-----GGGAAATTCCTCATCGCTGA

Candida/1-1104      CACTACAACCAACACATCAACCAGAACAACAAGAACAACAACATGAAATATATTTAAAAA
Saccharomyces/1-717 CGACGTACCTGC-----CGTAGACAACAACA---ATTGTTTGTATG-
Kluyveromyces/1-852 AGATGGTACCAA-----CAGCGACAACAAAA--ATATAGATATGAGAA

Candida/1-1104      GTGAATCAAAGACGCTTTTGGAAATACCATCACCACTTTCATTCCATGATCCCCAT
Saccharomyces/1-717 --CGGTGGCTCGCGGTTGGCAGACCCACTCTGCGAC-----
Kluyveromyces/1-852 ACCAGAACTGGCGAAGTGGAACTCTTGGTGAC-----

Candida/1-1104      TACAAATTGATATAGATACTTATCATCATCATCAACCTCCCTTCTCCTCATCATCGT
Saccharomyces/1-717 -----GATATAGCGGA---AACAGTCTACCCTTTGAC-----
Kluyveromyces/1-852 -----GGTACCTCTGA-----ACTAACTCCGACTTGT-----T

Candida/1-1104      TAATTCATCTTCC-----GGTCCACTAATCACTCT---TAGC-GATTAGC
Saccharomyces/1-717 AATCAATGATCTTGACATTGGCGTAATCCAGAA
Kluyveromyces/1-852 GAACTGAACCTCAGATATAATAAGTCCAATCGCTTGACATAGGGCAATCCAGAA

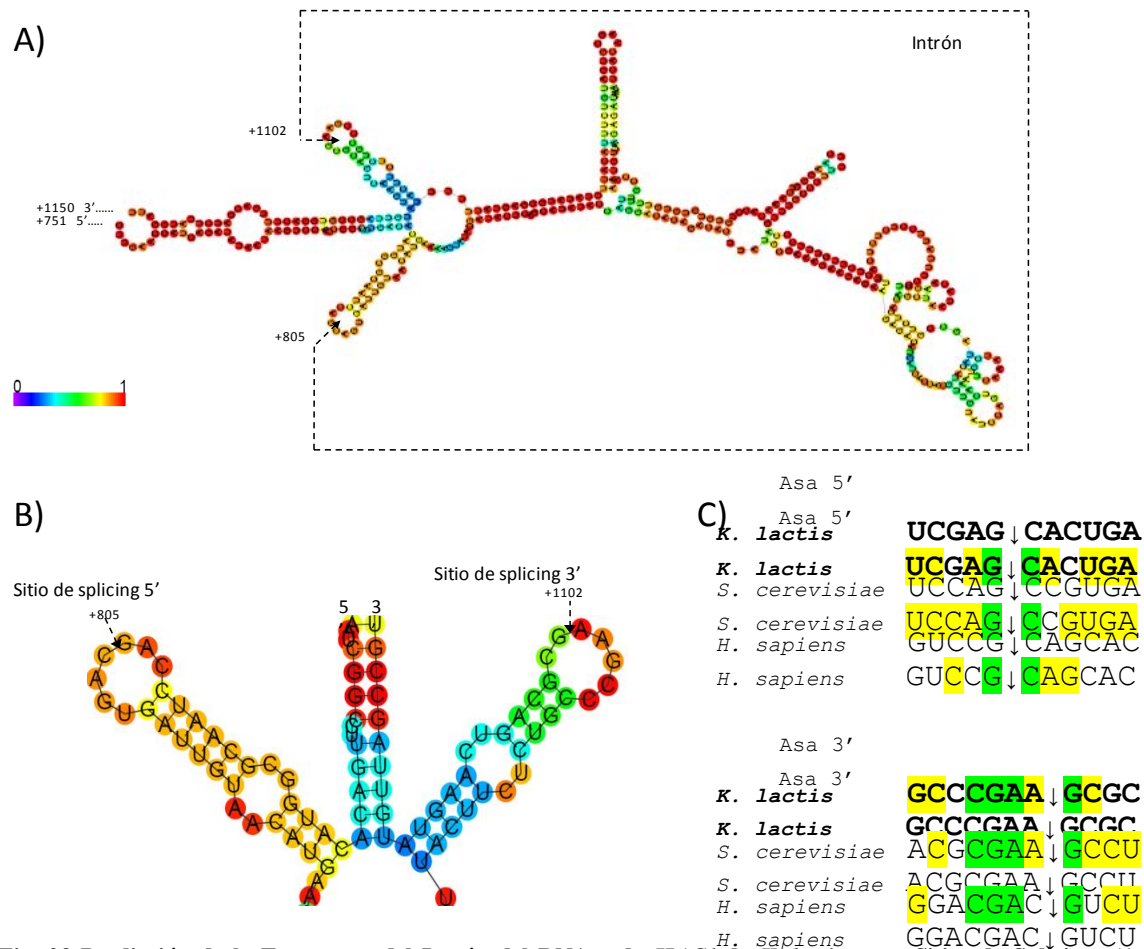
Candida/1-1104      AGCCAATAAACACTCAGTGGACTTTGATGATTTTTTCGATTTAGGAGATGAT
Saccharomyces/1-717 CGCGAGTCAGTTTAATAATTGAATGAATGAATCTCTATCACTTCATGA-----
Kluyveromyces/1-852 CGCGAGTCAATAGTTAGCGTGGACTTTGACCACTTAA-----GGAT-----

Candida/1-1104      GTTGAAGTTCATAAAGTCTAA
Saccharomyces/1-717 -----
Kluyveromyces/1-852 -----

```

**Fig. 22** Alineamiento de nucleótidos del mensajero sin procesar de *HAC1* de *K. lactis*, *S. cerevisiae* y *C. albicans*. En verde se marcan los nucleótidos aledaños al sitio de splicing 5' del primer exón y en rojo los aledaños al sitio 3' del segundo exón. La flecha indica el sitio de splicing. En amarillo se muestra los nucleótidos codificantes para el sitio de unión a DNA, altamente conservados (Clustal Muscle).





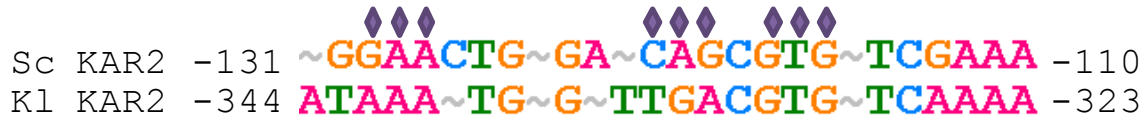
**Fig. 23 Predicción de la Estructura del Intrón del RNAm de *HAC1* de *K. lactis* y sus Sitios de Splicing.** A) Se muestra la predicción secundaria de la estructura del mensajero de *HAC1* flanqueada en 5' y 3' por parte de los exones. Se señalan con flechas el sitio de corte de Ire1p y en línea punteada se enmarca la estructura de todo el intrón. Los colores de fríos a calientes señalan la probabilidad de apareamiento de bases. Modelo basado en estructura secundaria con menor energía libre. B) Una vista más cercana de la secuencia y las estructura tallo asa en las regiones 5' y 3' de los sitios de splicing. (Vienna RNAfold) C) Alineamiento de las secuencias de las asas de *HAC1* en *K. lactis*, *S. cerevisiae* y *XBPI* en *H. sapiens*, mostrando el grado de conservación entre los nucleótidos. En verde se marcan los nucleótidos compartidos por los tres y en amarillo los nucleótidos compartidos solo por dos de las especies. Las flechas marcan el sitio de splicing.

En *K. lactis*, 21 pb (-32 al -52) de la región UTR 5' pueden tener una interacción de apareamiento de bases con con los nucleótidos +909 al +936 del intrón del mismo mensajero (subrrayados en la figura 18) produciendo el impedimento estructural que detendría la traducción del mensajero sin procesar puesto que los ribosomas ya anclados al mensajero no podrían continuar traduciendo (Fig. 24). Esto concuerda con lo ya descrito para *S. cerevisiae* (Chapman y Walter, 1997; Rügsegger *et al.*, 2001, Aragon *et al.*, 2009)



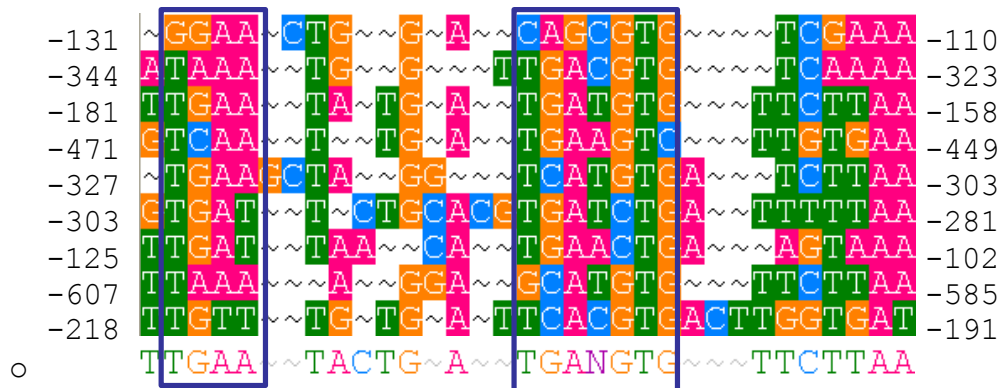


Identificamos una secuencia consenso en el promotor de *KAR2* de *K. lactis* mediante el alineamiento de la secuencia de 22 pb propuesta por Mori y colaboradores (1996) para *S. cerevisiae* (UPRE) con la región del -479 al -282 el promotor de *KAR2*. Esto nos dio como resultado una secuencia de 22 pb del -344 al -323 (Fig. 26).



**Fig. 26** Posible secuencia reguladora del promotor de *KAR2* y *HAC1* de *K. lactis* para la UPR. Por medio de alineamientos pareados (BioEdit 7.0.0).

Posteriormente alineando esta secuencia de *K. lactis* con la región de -600 pb que correspondería al promotor de *HAC1*, encontramos otra secuencia similar. Con estas dos se alinearon otras regiones de -600 pb de genes conocidos de UPR en *K. lactis* (Fig. 27) y como control, otros tantos que sabe no responden la UPR (no mostrados). Con el alineamiento de las posibles secuencias UPRE fue generada una secuencia consenso.



**Fig. 27** Alineación de las Posibles Secuencias UPRE de Genes Blanco de *Hac1p* en *K. lactis*. Los números en negativo a ambos lados indican la localización de la secuencia en relación con el sitio de inicio de la traducción marcado como +1 (no mostrado). Los nucleótidos más importantes y críticos para el funcionamiento de la secuencia UPRE de *S. cerevisiae*, también se encuentran conservados en varios genes blanco de *Hac1p* en *K. lactis* (BioEdit 7.0.0).

Esta secuencia fue utilizada para hacer una matriz consenso con todas las posibles posiciones y repeticiones de cada nucleótido para compararla con todos los promotores del genoma de *K. lactis* en un genome-scale patser (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>). Este Blast arrojó 28 ORF's aun no estudiados pero que pudieran tener algún efecto en la UPR; algunos tienen similitud con otros de *S. cerevisiae*, entre ellos se encuentran genes relacionados con tráfico vesicular y transporte la Golgi, además de biogénesis de la pared celular. Este último análisis se tiene que probar de manera experimental para ver que efectivamente hablamos

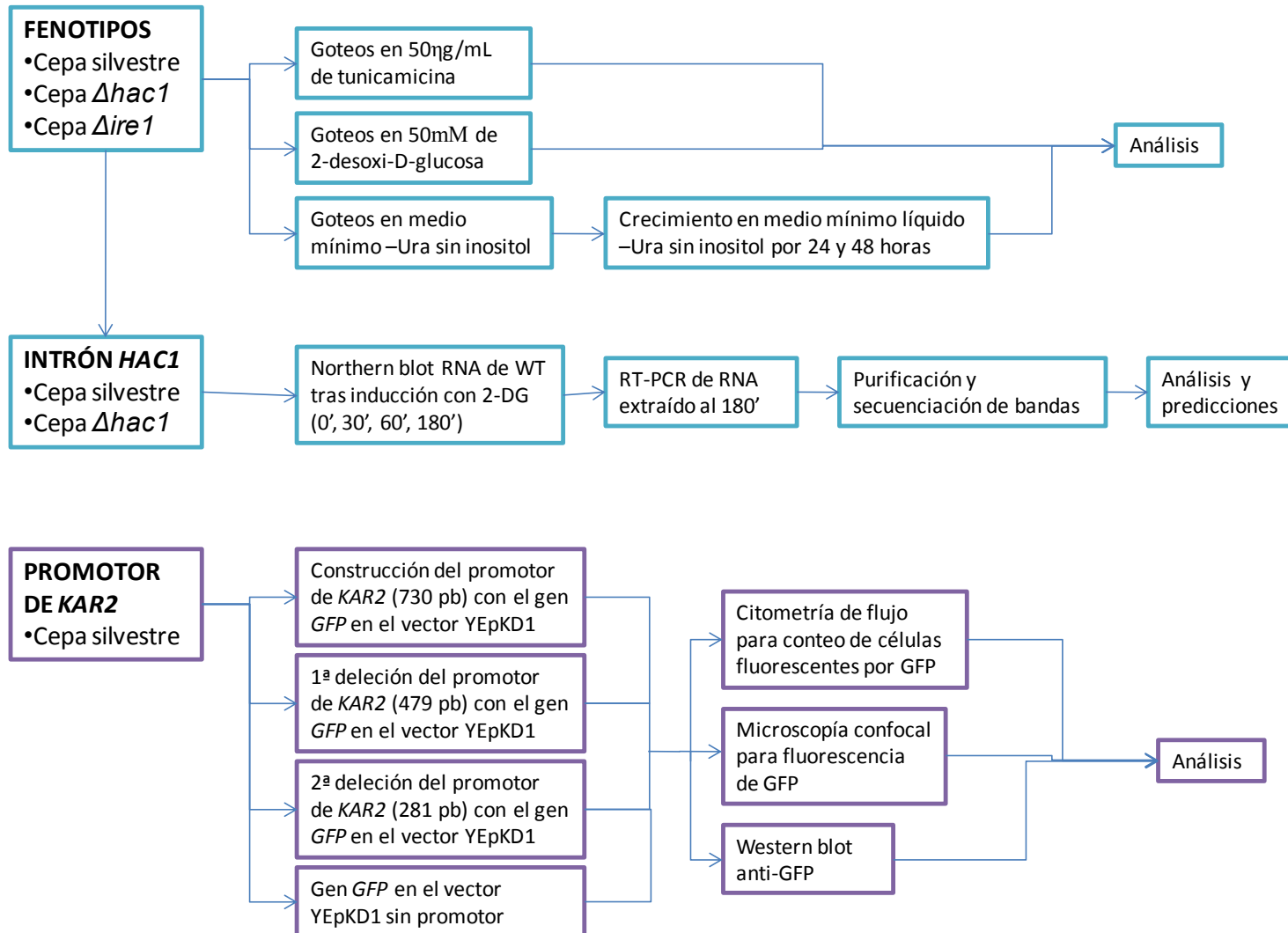
de la secuencia regulatoria del promotor para el anclaje de Hac1p en respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico.

## 10. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

- I. Las cepas *Δire1* y *Δhac1* aunque presentan fenotipo de sensibilidad a agentes causantes de estrés de retículo como 2-DG, Tm y DTT, no presentan auxotrofia para inositol. Por lo que la síntesis de inositol se realiza de manera independiente a estos dos elementos. Es necesario determinar el papel de Ire1p en la vía de síntesis de inositol, ya que se observa sensibilidad a la ausencia de inositol en el medio, más no auxotrofia.
- II. El mensajero de *HAC1* de *K. lactis* contiene un intrón que se procesa por un mecanismo independiente de spliceosoma que se induce por la presencia de agentes causantes de estrés de retículo endoplásmico. Puede presentar una estructura secundaria tallo-asa que se ha identificado como sitio de anclaje de Ire1p. También puede aparearse con la región UTR 5' para la atenuación de la respuesta. Pero aun está por resolverse, la vida media de Hac1p y si ésta se encuentra regulada por alguna señal contenida en su secuencia aminoacídica.
- III. El promotor de *KAR2* contiene una región que responde a la presencia de agentes causantes de estrés de retículo endoplásmico. Dicha región se observó en otros genes que pudieran estar relacionados con la respuesta a proteínas mal plegadas. Sin embargo, esto no ha sido comprobado experimentalmente; un gen que también se sabe experimentalmente que tiene la UPRE en *S. cerevisiae* es *HAC1*. Éste es otro modelo de promotor en el cual se puede probar la hipotética UPRE de *K. lactis*, dado que *HAC1* supuestamente se autoregula para la respuesta sostenida de la vía UPR.
- IV. Estudios posteriores enfocados en la secuencia UPRE reportada en esta tesis como posible sitio de unión de Hac1p, podrán determinar si se trata de un dominio regulatorio, sus componentes indispensables y posibles grados de intensidad de respuesta, es decir, qué nucleótidos son indispensables para el anclaje u actividad de Hac1p.
- V. Continuar analizando la región del -479 al -282 del promotor de *KAR2* en busca de otras posibles zonas regulatorias para la UPR

## 11. ANEXOS

### 11.1. Diagrama general de procesos



11.2. Tabla completa de micrografías de la respuesta del promotor de *KAR2*

	Sin Inducción			Inducidas 20mM 2-DG					
	(-)			30'			60'		
	Células	GFP	Merge	Células	GFP	Merge	Células	GFP	Merge
WT									
GFP									
281									
479									
730									

**Micrografías de la Respuesta del Promotor de *KAR2*.** Células WT transformadas con las 4 construcciones del promotor de *KAR2* y GFP se ajustaron a DO600 0.3. Se observaron con microscopía confocal sin inducción y a los 30' y 60' de la inducción con 20mM de 2-desoxi-D-glucosa. Se muestran 3 imágenes, primero las células a simple vista, segundo la toma de fluorescencia y tercero, el sobre lapo de las dos anteriores.



## 12. ABREVIATURAS

aa.- aminoácido

bZIP.- “zipper” básico

C terminal.- carboxilo terminal

ER.- retículo endoplásmico

GFP.- proteína verde fluorescente

LB.- medio Luria-Bertani

N terminal.- amino terminal

pb.- pares de bases

PCR.- reacción en cadena de la polimerasa

SD.- medio mínimo para levadura

SDS-PAGE.- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

UPR.- respuesta a proteínas mal plegadas

UPRE.- element de la respuesta a proteínas mal plegadas

UTR.- región no traducida

WT.- cepa silvestre

YPD.- medio rico para levadura

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Aragon, T., Van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korennykh, A.V., Rubio, C.A., Walter, P. (2009) Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signaling sites. *Nature*. 457: 736-740
- Back, S. H., Schröder, M., Lee, K., Zhang, K., Kaufman, R. (2005) ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*. 35: 395-416
- Burda, P., Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1426: 239-257
- Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zúñiga, M., Brown, P., Ploegh, H. (2000) Degradation of the proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Molecular Cell*. 5: 729-735
- Chapman, R.E., Walter, P. (1997) Translational attenuation mediated by an mRNA intron. *Current Biology*. 7: 850-859
- Collart, M.A., Oliviero, S. (1993) Preparation of yeast RNA. En: Jansseen, K. (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, Unit 13.12, Vol. 2.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 73: 1197-1206
- Cox, J.S., Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 87: 391-404
- Cox, J.S., Chapman, R.E., Walter, P. (1997) The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 8: 1805-1814
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, S., Brodsky, J.L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual Review of Genetics*. 35: 149-191
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. 2: 379-384.
- Gething, M.J., Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*. 355: 33-45
- Gonzalez, T.N., Sidrauski, C., Dörfler, S., Walter, P. (1999) Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *The EMBO journal*. 18: 3119-3132
- Helenius, A., Marquardt, T., Braakman, I. (1992) The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Cell Biology*. 2: 227-231
- Hubbard, S.C., Ivatt, R.J. (1981) Synthesis and processing of asparagines-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*. 50: 555-583.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28
- Jakobsen B.K., Pelham, R.B. (1991) A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *The EMBO journal*. 19: 369-375
- Kaneko, M., Nomura, Y. (2003) ER signaling in unfolded protein response. *Life Sciences*. 74: 199-205
- Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., George-Hyslop, P.S., Tohyama, M. (2001) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's

- disease-linked presenilin-1 mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 43446–43454.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St. George-Hyslop, P., Takeda, M., Tohyama, M. (1999) Presenilin-1 mutation downregulates the signaling pathway of the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*. 8: 479–485.
- Kaufman R.J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes and Developments*. 13: 1211-1233
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1997) Endoplasmic Reticulum Stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the Unfolded Protein Response. *Molecular Biology of the Cell*. 8: 1845-1862
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1998) Unconventional splicing of *HAC1/ERN4* mRNA required for the unfolded protein response. *The journal of Biological Chemistry*. 273: 1802-1807
- Kawasaki, L., Castañeda-Bueno, M., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala, N., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L., Coria, R. (2008) Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*. 7: 78-85
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K. (2004) The role of BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein *Ire1*. *The Journal of Cell Biology*. 167: 445-456
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., Kohno, K. (2007) Two regulatory steps of ER-stress sensor *Ire1* involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of Cell Biology*. 179: 75-86
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., Mori, K. (1993) The promoter region of the yeast *KAR2* (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 877-890
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*. 88: 427-430
- Korennykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A, Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., Walter, P. (2009) The unfolded protein response signals through high order assembly of *Ire1*. *Nature*. 457: 697-694
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*. 54: 631-664
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., Sambrook, J. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. 322: 462-464
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- Latchman, D.S. (1990) Eukaryotic transcription factors. *Biochemical Journal*. 270(2): 281-289
- McCaskill, J.S. (1990) The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structures. *Biopolymers*. 29: 1105-1119

- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, J.M., Sambrook, J. (1992) A 22bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO Journal*. 11: 2583-2593
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J. (1993) A transmembrane protein with *cdc<sup>2+</sup>*/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 74: 743-756
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. (1996) Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells*. 1: 803-817
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., yanagi, H., Yura, T. (1998) Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 9912-9920
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. (2000) mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *PNAS*. 97: 4660-4665
- Nicholson, R.C., Williams, D.B., Moran, L.A. (1990) An essential member of the HSP70 gene family of *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein. *PNAS*. 87: 1159-1163
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J., Sambrook, J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell*. 57: 1223-1236
- Nikawa, J.I., Yamashita, S. (1992) *IRE1* encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 6: 1441-1446
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H. (2002) *ASK1* is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Development*. 16: 1345-1355.
- Nojima, H., Sun-Hee, L., Araki, H., Sakai, A., Nakashima, N., Kanaoka, Y., Ono, Y. (1994) *Hac1*: a novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for *cdc10* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*. 22: 5279-5288
- Nunnari, J., Walter, P. (1996) Regulation of organelle biogenesis. *Cell*. 84:389-394
- Obreyé, E.H., Maurer, K., Mager, W.H., Planta, R.J. (1993) Structure of the *ABF1*-homologue from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochimica et biophysica acta*. 1173: 233-236.
- Ogawa, N., Mori, K. 2004. Autoregulation of the *HAC1* gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes to cells*. 9: 95-104
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., Kohno, K. (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279: 445-450
- Pal, B., Chan, N.C., Helfenbaum, L., Tan, K., Tansey, W.P., Gething, M.J. (2007). SCF<sup>Cdc4</sup>-mediated degradation of the Hac1p transcriptional factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 18: 426-440
- Patil, C., Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Cell Biology*. 13: 349-355

- Patil, C.K., Li, H., Walter, P. (2004) Gcn4p a novel upstream activating sequences regulated targets of the unfolded protein response. *PLoS Biology*. 2: e246
- Plempner, R.K., Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Biochemical Sciences*. 24: 266-270
- Posas, F., Saito, H. (1997) Osmotic activation of the *HOG* MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*. 276: 1702-1705
- Resendez, E., Wooden, S.K., Lee, S. (1988) Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulates protein. *Molecular and Cellular Biology*. 8: 4579-4584
- Richie, D.L., Hartl, L., Aimanianda, V., Winters, M.S., Fuller, K.K., Miley, M.D., White, S., McCarthy, J.W., Latgé, J.P., Feldmesser, M., Rhodes, J.C., Askew, D.S. (2009) A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigates*. *PLOS pathogens*. 5: 1-17
- Rogers, S., Wells, S., Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234: 364-368
- Rose, M.D., Misra, L.M., Vogel, J.P. (1989) *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*. 57: 1211-1221
- Rüeggsegger, U., Leber, J., Walter, P. (2001) Block of *HAC1* mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*. 107: 103-114
- Selye, H. (1986) Estado actual de las investigaciones del estrés. *Endocrinología Psicosomática*. Ed. Morata, Madrid.
- Shamu, C.E., Walter, P. (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO journal*. 15: 3028-3039
- Shen, X., Ellis, R.E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K., Kaufman, R.J. (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*. 107: 893-903
- Sidrauski, C., Cox, J.S., Walter, P. (1996) tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 87: 405-413
- Sidrauski, C., Walter, P. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 90: 1031-1039
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101: 249-258
- Urano, F., Bertolotti, A., Ron, D. (2000) *IRE1* and efferent signaling from endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*. 113: 3697-3702
- Weerapana, E., Imperiali, B. (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*. 16: 99R-101R
- Welihinda, A., Kaufman, J.R. (1996) The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of Biological Chemistry*. 271: 18181-18187
- Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K.D., Fukuhara, H. (1996) *Kluyveromyces lactis*. En: K. Wolf, editor. *Non-conventional yeast in biotechnology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 139-201.

- Wimalasena, T.T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A.J.P., Archer, D.B. (2008) Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of *Hac1* in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 1235-1247
- Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I.L., Shuster, P. (1999) Complete suboptimal folding of RNA and the stability of secondary structures. *Biopolymers*. 49: 145-165
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001) *XBPI* mRNA is induced by *ATF6* and spliced by *IRE1* in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 107: 881-891
- Yoshida, H. Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental Cell*. 4: 265-271
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., Lim, W.A. (2004) *Sho1* and *Pbs2* act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Molecular Cell*. 14: 825-832
- Zuker, M., Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information. *Nucleic Acids Reserch*. 9: 133-148