



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Establecimiento de un sistema heterólogo para el estudio de la respuesta a estrés hiperosmótico y estrés de retículo endoplásmico en *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

que para obtener el grado de

Licenciada en investigación biomédica básica

presenta

Natalia Adriana Martagón Calderón

Asesor: Dr. Roberto Coria Ortega



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Roberto, por todo lo que he aprendido.

A Bruni, Billy, Nanela y Cony, pues sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

A Damián, que me acompañaste en este camino.

A Ju, Dulce, Daniel, Pol, Rulo y compas del laboratorio, por hacer todo más ameno.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	5
Resumen	6
Introducción	8
<i>Kluyveromyces lactis</i>	8
Sistemas de respuesta a estrés	9
Transducción de señales moduladas por MAPKs	9
Estrés osmótico	11
Arquitectura de la vía de HOG	12
Sistema de fosforelevo	13
Participación de la via de HOG en la respuesta a agentes que inhiben la glicosilación de proteínas.	15
Antecedentes	17
Respuesta a estrés osmótico en <i>K. lactis</i>	17
Actividad de Ssk1	18
Diversidad de Sistemas de Fosfotransferencia eucariontes	19
Hipótesis	19
Objetivo	20
Objetivos Particulares	20
Metodología	21
Medios de cultivo	21
Cepas	21
Secuencias de genes utilizadas	21
Purificación de DNA	22
Transformación de E.coli	22
Transformación de levaduras	22
Construcción de mutantes con alelo <i>ste11</i> interrumpido (<i>ste11::nat</i>)	23
Apareamientos	23
Esporulación de diploides $\Delta ssk2/SSK2 \Delta ssk22/SSK22$	23

Esporulación de diploides $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ssk1$	24
Diseción de tétradas	24
Oligonucleótidos de marcos abiertos de lectura de <i>S. cerevisiae</i>	24
Amplificación de casete KanMX y casete Nat	25
Etiqueta histidinas en KISsk2 para subclonación en vector pYES	25
Inserción de KISsk1 en vector pSAL	25
Inserción de KISsk1 y KISsk1DA en pYX142	26
Inmunodetección de ScHog1p y ScHog1p fosforilado	26
Pruebas de crecimiento en sal, tunicamicina	26
Resultados	27
Genotipo de cepas obtenidas	27
Obtención de mutantes con alelo <i>ste11::nat</i>	28
Obtención de mutante $\Delta ssk2\Delta ssk22$. Amplificación de alelos silvestres	31
Determinación de sexo de mutante $\Delta ssk2\Delta ssk22$	32
Comprobación de mutantes $\Delta ssk2\Delta ssk22$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$. Amplificación de alelos interrumpidos con KanMX	33
Construcción de pSAL-KISsk1	35
Expresión de pSAL-KISsk1 en <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ssk1\Delta ste11$	36
Expresión de KISsk1 en $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$	38
Expresión de pYX142-KISsk1 y mutante puntual pYX142-KISsk1DA	39
Expresión de ScSsk1 y ScSsk1DA	42
Inmunodetección de ScHog1p activo en cepas expresando KISsk1 y KISsk1DA	44
Efecto de expresión KISsk1 en medios con tunicamicina	45
Crecimiento en tunicamicina cepa $\Delta ssk2\Delta ssk22$	47
Crecimiento de mutantes con alelo <i>ste11::nat</i> en tunicamicina	48
Discusión	49
Conclusiones	54
Bibliografía	55

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de CONACyT proyecto No. 80343 y DGAPA-PAPIIT No. IN210110.

Se agradece el apoyo técnico de Laura Kawasaki y del personal de la Unidad de Biología Molecular del IFC.

Resumen

Kluyveromyces lactis es una levadura con características fisiológicas y metabólicas importantes. La vía de respuesta a estrés hiperosmótico hasta ahora descrita en *S. cerevisiae* (también conocida como vía de HOG) cuenta con dos ramas sensibles a estímulos de alta osmolaridad, denominadas SLN1 y SHO. La rama SLN consiste en un sistema de fosforelevo, compuesto por una cinasa de histidina de membrana Sln1p, una proteína transferidora de fosfatos Ypd1p y el regulador de respuesta Ssk1p. Este sistema se encuentra activo en condiciones normales, previniendo la activación del módulo de MAP cinasas río abajo en la cascada de señalización. En condiciones de estrés hiperosmótico el sistema de fosforelevo se apaga, fenómeno que activa a las MAP cinasas Ssk2p/Ssk22 que a su vez fosforilan a la MAP cinasa cinasa Pbs2p y ésta a Hog1p, la cual se dirige al núcleo y controla la respuesta transcripcional necesaria para la osmoadaptación de la célula.

Contrario al efecto observado en *S. cerevisiae* y otros hongos estudiados, donde la mutación nula de los genes *SLN1* o *YPD1* resulta en una activación continua de Ssk1p y un fenotipo letal, en *K. lactis* las mutantes $\Delta sln1$ y $\Delta ypd1$ son viables y muestran una moderada sensibilidad en medios de hiperosmóticos. Además, mutantes en ambas levaduras son sensibles a tunicamicina y otros agentes causantes de estrés de retículo endoplásmico.

Para determinar si Ssk1p de *K. lactis* (KlSsk1p) es un homólogo funcional del regulador de respuesta de *S. cerevisiae* (ScSsk1p), se hicieron una serie de mutantes en *S. cerevisiae*, evaluando el efecto de la expresión en condiciones hiperosmóticas de dos versiones de la proteína de *K. lactis*: una versión silvestre, KlSsk1 y una mutante no fosforilable, KlSsk1DA.

Partiendo de una colección de mutantes nulas en un solo gen de *S. cerevisiae*, se realizaron las mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$, $\Delta ssk2\Delta ssk22$, $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ mediante apareamientos y selección de esporas segregantes así como por reemplazo de genes por recombinación homóloga. El alelo silvestre *STE11* que codifica la MAP3 cinasa de la rama de SHO fue reemplazado para inactivar esta rama también y poder observar fenotipos de crecimiento significativos en medios hiperosmóticos.

La expresión de KlSsk1 se evaluó primero con un plásmido de expresión multicopia y posteriormente, tanto KlSsk1 como la mutante KlSsk1DA en un plásmido unicopia bajo el control de un promotor constitutivo.

Las mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste1$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ son altamente sensibles a estrés hiperosmótico, como se observa en pruebas de crecimiento en goteo sobre medios adicionados con KCl o sorbitol. Se determinó que la expresión de K1Ssk1DA no causa un fenotipo letal y el defecto de osmosensibilidad en el fondo $\Delta ssk1\Delta ste11$ es complementado tanto por K1Ssk1, como por K1Ssk1DA. Dicha complementación se pierde en cepas que no expresan ScSsk2/22p. De acuerdo a los ensayos de inmunodetección realizados, las cepas mutantes expresando K1Ssk1 o K1Ssk1DA tienen bajo condiciones hiperosmóticas la forma fosforilada (y por tanto, activa) de ScHog1p.

Por otra parte, se evaluó la sensibilidad de las mutantes a tunicamicina, un inhibidor de N-glicosilación proteica, encontrando que las mutantes $\Delta ssk2$ y $\Delta ssk22$ (genes considerados redundantes) muestran una diferente sensibilidad a dicho agente y que la mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ es tan sensible como la cepa $\Delta ssk1$. No se advierte una complementación del fenotipo de sensibilidad a tunicamicina en cepas expresando K1Ssk1 o K1Ssk1DA.

En conclusión, el regulador de respuesta Ssk1p de *K. lactis* complementa los defectos de osmosensibilidad causados por la ausencia de *SSK1* en *S. cerevisiae*. La versión no fosforilable de K1Ssk1 no sobreactiva la vía de HOG y complementa también la mutación nula de ScSsk1p bajo condiciones de estrés hiperosmótico. Además, ScSsk1p y ScSsk2p mas no ScSsk2p, participan en la respuesta al inhibidor de N-glicosilación tunicamicina.

Introducción

Kluyveromyces lactis

Kluyveromyces lactis es un ascomiceto con características metabólicas y fisiológicas importantes. Es una levadura gemante con un ciclo de vida semejante a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo un ciclo vegetativo y uno sexual.

Comenzó a estudiarse a principios de 1960 con gran interés debido a sus propiedades con aplicación biotecnológica. *K. lactis* es un aerobio obligado y puede usar una amplia gama de fuentes de carbono en comparación con otras levaduras¹. Se ha adaptado utilizar como fuente de carbono la lactosa (O-β-d-galactopiranosil-(1-4)-β-d-glucosa) y es por ello que la mayoría de los estudios en esta especie se concentran en el metabolismo de azúcares. En la industria biotecnológica, se emplea en la expresión heteróloga de proteínas de alto peso molecular, es decir, la incorporación en este organismo de DNA o RNA mensajero codificante para una proteína que normalmente no se produce en dicho organismo. También se ha utilizado, junto con otras especies del género, para la degradación de lactosa y otros procesos en la industria de productos lácteos.

Se conocen dos tipos sexuales, el tipo “a” y el tipo “alfa” aunque a diferencia de especies como *S. cerevisiae*, las células diploides entran espontáneamente en fase meiótica y esporulación.

Su genoma fue secuenciado y publicado en 2004² junto con otras cuatro levaduras. Tiene un genoma de 10.6 Mb compuesto por seis cromosomas de entre 1 a 3 Mb. La redundancia de genes en este organismo suele ser mas baja que la de *S. cerevisiae*, esto debido posiblemente a que divergió antes de la duplicación genética que sufrió el grupo de las *Saccharomyces*. Las levaduras utilizadas para su análisis genómico en el estudio mencionado fueron seleccionadas debido a la distancia evolutiva que se suponía entre ellas y a las distintas condiciones ambientales en las que se encuentran. Esto ha generado una gran diversidad entre ellas. Por ejemplo, comparando la divergencia promedio de todos las proteínas en los ascomicetos en referencia a *S. cerevisiae*, existe entre los ascomicetos una diversidad evolutiva similar a la que hay entre peces y humanos^{3,4}.

K. lactis tiene características genómicas en común con otras levaduras como regiones intergénicas cortas, pocos casos de transferencia horizontal y un reducido número de intrones ó transposones. A pesar de ello, tiene características fisiológicas distintas y un nicho ecológico particular que hacen de interés el estudio de la percepción y respuesta a estímulos ambientales en este organismo.

Sistemas de respuesta a estrés

Todo organismo necesita mecanismos para responder y adaptarse a los constantes cambios ambientales a los que está expuesto. Para ello, necesita censar estímulos de diversos tipos y reaccionar ante ellos, ya sea en un contexto unicelular para asegurar la sobrevivencia de la célula o en uno multicelular como parte de un sistema biológico en coordinación. En este caso, la comunicación intercelular también es indispensable para la supervivencia.

Existen condiciones ambientales que desencadenan un conjunto de respuestas celulares comunes. Así mismo, se conocen estímulos concretos que, si bien en contextos naturales no siempre se presentan de forma aislada, encienden vías de señalización específicas en la célula. Es así que se conocen vías como las de respuesta a feromonas, a estrés de retículo endoplásmico, estrés osmótico, crecimiento filamentosos, etc. Muchos de estos sistemas de transducción de señales han sido descritos en levaduras y se conservan a lo largo de ramas filogenéticas eucariontes teniendo componentes equivalentes en mamíferos. De manera general, están compuestos por una o varias proteínas que detectan el estímulo (pudiendo ser a nivel extracelular, de membrana o intracelular) y lo convierten en señales intracelulares que provocan un cambio en el comportamiento de la célula, principalmente alterando la expresión génica. Las señales intracelulares son transmitidas por proteínas con distintas actividades que dirigen y modulan la respuesta. La fosforilación de proteínas es un mecanismo general para propagar estímulos y generar respuestas celulares⁵.

Transducción de señales moduladas por MAPKs

En eucariontes gran parte de las vías de transducción de señales están formadas por módulos de proteínas secuencialmente activadas, dentro de las cuales están las llamadas MAP cinasas (“mitogen activated proteins”, por sus siglas en inglés o MAPK’s). Bajo ciertos estímulos de proteínas río arriba de la cascada, proteínas MAPKKK con actividad de cinasas de serina/treonina se activan y fosforilan a una MAP cinasa cinasa (MAPKK). Ésta a su vez fosforila a una MAP cinasa (MAPK) en un residuo de treonina (a veces serina) y uno de tirosina que están localizados adyacentemente y separados por un aminoácido cualquiera (Thr/Ser-X-Tyr), como se esquematiza en la Figura 1. La MAP cinasa activada por la adición de los dos grupos fosfato, es capaz de trasladarse al núcleo para activar proteínas blanco como factores de transcripción y formar parte de complejos activadores o represores de transcripción⁶. Además, las MAPKs también pueden regular la expresión génica a nivel post-transcripcional y tener importantes funciones post-traduccionales.

En *S. cerevisiae* se conocen cinco MAPK que contienen el motivo clásico de fosforilación en el asa de activación⁶; de estas Fus3p funciona durante la respuesta a feromonas y apareamiento; Kss1p regula el crecimiento filamentoso provocado por la falta de fuentes de nitrógeno en el medio y Hog1p participa en la respuesta a estrés osmótico. Esta última cinasa es homóloga a p38 de mamíferos, donde tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria y a varios tipos de estrés.

Uno de los modelos para explicar la especificidad de respuesta ante distintos estímulos utilizando y compartiendo un número limitado de elementos celulares, es mediante el uso de proteínas de andamiaje. En levadura, se han identificado 18 proteínas de este tipo. Cuentan con dominios de interacción a través de los cuales se unen más componentes de una vía particular, formando complejos temporal y espacialmente definidos. De esta manera, es probable que aumente la concentración local de componentes clave y con ello la velocidad de reacción entre moléculas específicas⁷.

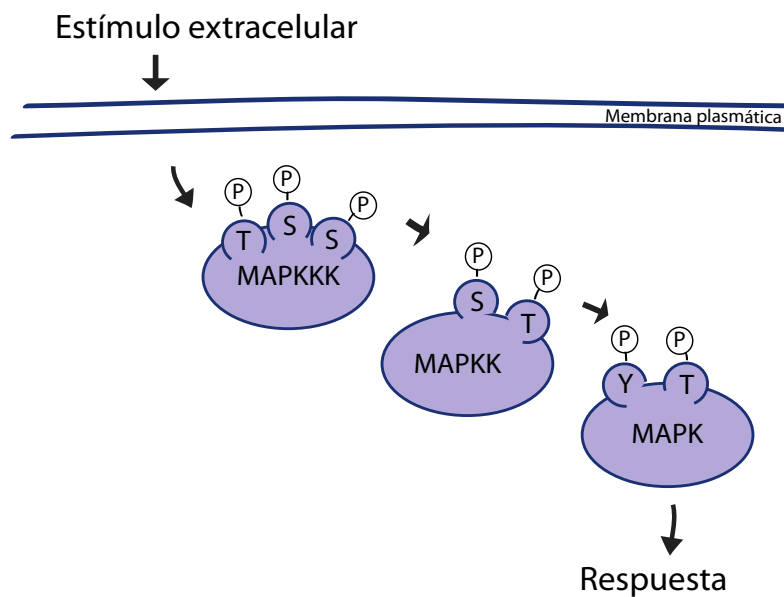


Figura 1 Representación de las cascadas de fosforilación en los módulos de MAP cinasas (Adaptado de Kawasaki, et al.⁵).

Ante un estímulo extracelular, la MAPKKK es blanco de fosforilación (P) en los residuos indicados por uno o más elementos que perciban el estímulo. Esta actúa entonces sobre la serina o treonina de una MAPKK, que a su vez fosforila a una MAPK en los residuos treonina y tirosina para continuar transmitiendo la señal.

Estrés osmótico

La presión osmótica es generada por diferencias de concentración de osmolitos entre el exterior e interior de una membrana permeable. El cambio en el volumen celular causado por el flujo de agua en condiciones hipo o hiperosmóticas altera la concentración de biomoléculas y iones en el interior de la célula. Esto a su vez modifica las interacciones entre moléculas, comprometiendo la estabilidad de las proteínas y su actividad enzimática, pudiendo ser letal para las células si no se restablece el equilibrio osmótico.

La forma en la que las células eucariontes contienen contra este tipo de estrés es produciendo solutos compatibles como glicerol o trealosa, controlando canales de flujo de glicerol en la membrana y transportadores de iones como el de sodio⁸.

En levaduras, esta respuesta está controlada por la vía de HOG (“High Osmolarity Glicerol”). Es una vía con componentes homólogos otros eucariontes como mamíferos, aunque las funciones específicas entre sus componentes varían. El sistema de respuesta de HOG está compuesto de dos vías sensoras que confluyen en un módulo de MAPKs hasta activar a Hog1p, la cinasa que al fosforilarse se desplaza al núcleo regulando diversos factores de transcripción.

Hog1p de *S. cerevisiae* se detecta en su forma activa a pocos minutos de enfrentar a las células a un choque hiperosmótico y la concentración más alta de glicerol intracelular, producido como resultado de la actividad de Hog1p, se observa alrededor de los 20 minutos después del estímulo⁹.

Los factores transcripcionales Sko1p, Hot1p, Msn1p, Msn2p, Msn4p y Sgd1p dependen de la cinasa Hog1p fosforilada. Son proteínas que pertenecen a familias estructurales distintas y tienen funciones tanto activadoras como represoras, probablemente por ello el mecanismo de control por Hog1p difiere entre cada caso¹⁰. Dos ejemplos de ello son Sko1p y Hot1p. Sko1p es un represor en condiciones iso osmóticas de genes como el de la fosfatasa *PTP3*, que regula negativamente la vía desactivando a Hog1p. Durante la respuesta osmoadaptativa Hog1p se asocia a Sko1p, esta última se fosforila y convierte entonces en activador de la transcripción de *PTP3*¹¹. Hot1p, es un activador que recluta a Hog1p a los promotores de genes relacionados con la síntesis e internamiento de glicerol, como la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (*GDPI*).

Mediante varios estudios de transcripción global se sabe que alrededor de 200-400 genes son activados bajo condiciones hiperosmóticas en *S. cerevisiae*, y entre 200 y 250 son reprimidos⁸. Son pocos los genes identificados que se regulan exclusivamente por la activación de la vía de HOG pues su expresión cambia también bajo otros tipos de estrés. A este fenómeno se le conoce como la respuesta general a estrés y se cree que sea un mecanismo con el cual las levaduras estén preparadas para más de una condición ambiental potencialmente dañina.

Arquitectura de la vía de HOG

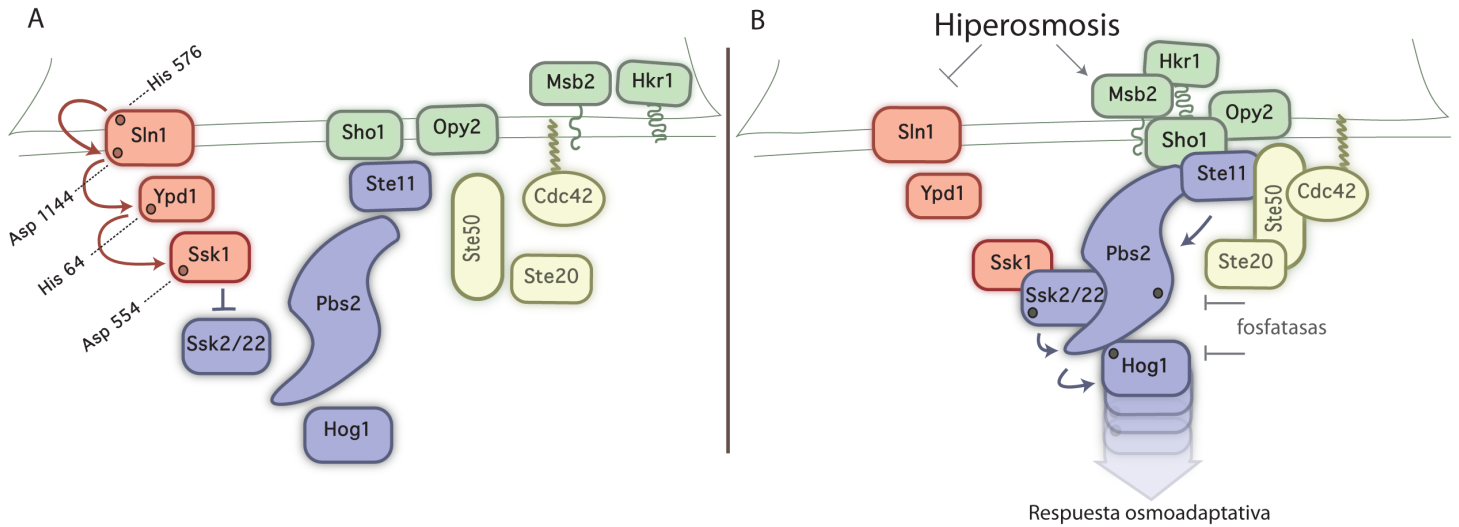


Figura 2 Vía de HOG

Representación de proteínas de la vía de HOG en *S. cerevisiae* en condiciones normales (A) donde se representan las reacciones de fosfotransferencia, y en condiciones de alta osmolaridad (B) donde se representa la activación por fosforilación del módulo de MAP cinasas. En rojo se representan componentes del sistema de fosforelevo, en morado el módulo de MAP cinasas y en amarillo y verde componentes de la vía de SHO.

Como se mencionó antes, la vía de HOG cuenta con dos ramas de proteínas transductoras de la señal, denominadas SHO1 y SLN1, que confluyen en un módulo de MAP cinasas compuesto por la MAPKK Pbs2p y la MAPK Hog1p.

Si bien el mecanismo por el que se detectan los cambios de osmolaridad en el medio no está claramente determinado, se han identificado proteínas transmembranales que participan en esta respuesta mediante mutaciones nulas de estos componentes, las cuales provocan una disminución del crecimiento de cultivos (fenómeno rutinariamente denominado como sensibilidad) en medios hiperosmóticos. Dentro de la rama de SHO se encuentran Sho1p, y las mucinas transmembranales Opy2p y Msb2p^{12 13}, como se representa en la Figura 2. De acuerdo al modelo de activación para esta rama es necesaria la formación de un complejo en donde ocurren las siguientes interacciones; Pbs2p, que es una proteína de andamiaje además de contar con actividad de cinasa, es reclutada a la membrana mediante Sho1p. Cdc42p se requiere para reclutar y activar a la proteína tipo PAK Ste20p y al substrato de ésta, la MAPKKK Ste11p. La interacción de Ste20p activa con Ste11p es facilitada por la proteína de andamiaje Ste50p quien tiene dominios de unión heterotípicos con los que se une, por un lado a Ste20p (dominios tipo SAM) y por otro con Cdc42p (dominios tipo RA). Una vez activada, Ste11p fosforila a Pbs2p y ésta a Hog1p. Hog1p fosforilada se dirige al núcleo, donde interactúa con los factores transcripcionales anteriormente mencionados para promover la expresión de genes blanco. De esta manera se expresan enzimas productoras de glicerol, se transporta glicerol al interior de la célula y se cierran canales de salida para el mismo.

La mayoría de los componentes de esta rama como Sho1p, Opy2p, Ste11p, Ste50p y Cdc24p, juegan también un papel en las vías de apareamiento entre levaduras o de crecimiento filamentoso.

La rama de SLN1 descrita en *S. cerevisiae* está compuesta por un sistema de fosfotransferencia o fosforelevo en el cual las proteínas Sln1p, Ypd1p y Ssk1p, se fosforilan secuencialmente. Este sistema está conectado a Pbs2p mediante las MAPKKK redundantes Ssk2p y Ssk22p (Figura 2).

Aunque las ramas SLN1 y SHO1 son redundantes en cuanto al uso de los componentes Pbs2p y Hog1p en el proceso de osmoadaptación, responden de manera distinta a la intensidad del estímulo, siendo la rama SLN1 más importante como inductora de genes dependientes de Hog1p a niveles moderados de estrés hiperosmótico y la rama de SHO1 a concentraciones mayores de osmolitos como KCl o sorbitol¹⁴. Lo anterior sugiere el uso de distintos mecanismos sensores.

Sistema de fosforelevo

Los sistemas de fosforelevo, también llamados de dos componentes, han sido ampliamente estudiados en bacterias y fue la serie Sln1p-Ypd1p-Ssk1p de *S. cerevisiae* la primera descrita en eucariontes. Hasta ahora se han identificado sistemas de fosforelevo en otras levaduras, mohos mucilaginosos y plantas, mas no en organismos animales. En *K. lactis* sólo se ha estudiado este sistema dentro de nuestro grupo de investigación. En general, estos sistemas se caracterizan por tener proteínas cinasas de histidina (HK) y reguladores de respuesta (RR) con los que las células responden a estímulos externos como alta osmolaridad, reguladores de crecimiento, quimio-atrayentes y radiación ultravioleta, entre otros. Las cinasas de histidina poseen dos dominios conservados: a) el de dimerización, que contiene un residuo histidina fosforilable y b) el sitio catalítico o de unión a ATP. Cada HK tiene dominios variables en el extremo amino según el estímulo al que respondan¹⁵. Ante un estímulo determinado, un monómero de HK se dimeriza con otro y auto-*trans*fosforila el residuo conservado de histidina. Algunas HKs tienen también actividad de fosfatasa sobre el regulador de respuesta que activen.

Los reguladores de respuesta catalizan la transferencia del fosfato de la fosfo-histidina en las HK hacia un residuo de ácido aspártico en su propia cadena. La fosforilación de ese ácido aspártico en los reguladores de respuesta controla a manera de interruptor su función efectora, que puede consistir en regulación directa de procesos transcripcionales o en la activación de otros elementos río abajo en cascadas de señalización. Ya que los dominios HK y RR funcionan modularmente, existen múltiples estructuras de los sistemas de fosforelevo donde varía la disposición de los dominios dentro de una proteína o entre los componentes de la vía. La mayoría de las cinasas de histidina eucariontes cuentan con su propio dominio regulador de respuesta, llamadas en este caso cinasas de histidina híbridas (Robinson, 2000). Además, existen dominios que únicamente transfieren fosfato (llamados HPt). Con ellos se aumentan los pasos de fosforilación o

“número de relevos” en un sistema; de una secuencia de transferencias tipo His→Asp convencional, a una forma His→Asp→His→Asp. Los dominios HPt tienen una histidina conservada, distinta a aquella en los dominios de dimerización, y pueden ser parte de las cinasas de histidina o ser proteínas independientes. En el caso del sistema osmosensor Sln1p-Ypdp-Ssk1p de *S. cerevisiae*, Sln1p es la cinasa de histidina que se autofosforila en el residuo His576. El fosfato se transfiere luego al residuo Asp1144 en el dominio regulador de la misma⁹. Después Ypd1p, mediante el dominio Hpt, recibe el fosfato en la histidina His64 y lo transfiere a Ssk1p en el sitio Asp554. En condiciones normales, Sln1 se encuentra constitutivamente fosforilada, transfiriendo fosfatos a Ypd1p la cual a su vez fosforila a Ssk1p (Figura 2, panel izquierdo). La versión fosforilada de Ssk1p inhibe a las MAPKKKs Ssk2p y Ssk22p, bloqueando así la activación de Pbs2p y Hog1p. En respuesta al estrés el sistema se reprime rápidamente, resultando en la activación de Ssk2p y Ssk22p, lo que activa a Pbs2 y Hog1p (Figura 2, panel derecho). Aunque el sistema de fosforelevo se utiliza en numerosas especies de hongos para responder a estímulos ambientales y estrés de diversos tipos, el mecanismo por el que lo hacen difiere entre los casos descritos¹⁶.

Los reguladores de respuesta pueden ser blanco de múltiples cinasas de histidina, pero en *S. cerevisiae* la única cinasa sensora es Sln1p. Tampoco se tiene identificada otra proteína transferidora de fosfatos como Ypd1p. Siguiendo con la diversidad de sistemas de fosforelevo, hay HKs que transfieren grupos fosfato a más de un regulador de respuesta, por ejemplo en la cinasa de quimiotaxis bacteriana CheA, que fosforila a los reguladores CheY y CheB¹⁷.

En el caso de *S. cerevisiae*, la proteína de choque térmico Skn7p está involucrada en procesos como el mantenimiento de la integridad de pared celular, ciclo celular y respuesta a estrés oxidativo. Se ha observado que recibe fosfatos mediante Sln1p y Ypd1p, aunque es dispensable para la respuesta a estrés oxidativo¹⁸.

Participación de la vía de HOG en la respuesta a agentes que inhiben la glicosilación de proteínas.

La vía de HOG tiene otras funciones además de conferir osmotolerancia. Se requiere para la adaptación de *S. cerevisiae* a choques de alta y baja temperatura así como a medios con ácido cítrico. Así mismo, está involucrada en el mantenimiento de la pared celular¹⁹.

Hog1p y Pbs2p son importantes para tolerar agentes como tunicamicina o los reductores B-mercaptoetanol²⁰ y dithiothreitol²¹. Estos compuestos se utilizan rutinariamente para generar estrés de retículo endoplásmico. La tunicamicina es un agente natural que inhibe la N-glicosilación en eucariontes bloqueando específicamente a la enzima N-acetil glucosamina fosfotransferasa (GPT)²². La interrupción del proceso de glicosilación provoca un mal plegamiento de proteínas, generando una sobrecarga de estas en el retículo endoplásmico. Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* y *K. lactis* responden a este estrés activando la vía de respuesta a proteínas desdobladas (UPR, por sus siglas en inglés). Esta vía es una forma en células eucariontes de ajustar la capacidad de plegamiento de las proteínas residentes o sintetizadas en el retículo endoplásmico. La UPR es una respuesta fisiológica conservada que involucra la señalización desde el RE para que, en principio, la célula regrese a un estado homeostático mediante a) la expresión de genes que aumentan la capacidad de plegamiento de proteínas en el RE y de b) genes para la degradación asociada a RE (ERAD)²³. Dentro de la primera categoría se encuentran genes codificantes para chaperonas de familias como HSP70 y HSP90. Se le llama degradación asociada a RE a la eventual “retrotranslocación” de las proteínas mal plegadas al citoplasma donde son ubiquitinas y posteriormente degradadas por el proteasoma. Si la sobrecarga de proteínas desdobladas no se resuelve se activan procesos pro-apoptóticos mediante componentes de la UPR. Los elementos principales que componen esta vía son Ire1p, Bip y Hac1p (Figura 3). En levaduras, Ire1p (“inositol requiring kinase 1”) detecta cambios en las condiciones de plegamiento dentro del lumen del RE. Es una proteína integral de la membrana del retículo, teniendo una porción dentro de su lumen y otra en el citosol. La chaperona de RE Bip se une a esta proteína en condiciones normales y previene su activación. Aunque hay varias hipótesis sobre el mecanismo molecular por el cual Ire1p se activa ante el aumento de proteínas desdobladas, se sabe que al hacerlo es capaz de formar homodímeros y trans-autofosforilarse. Con ello, se activa el dominio de endoribonucleasa que contiene y que es capaz de procesar, independiente de la maquinaria convencional de splicing, a un intrón del RNA mensajero de Hac1p, que de esa forma codifica para un activador transcripcional específico y necesario para que se de la respuesta²⁴.

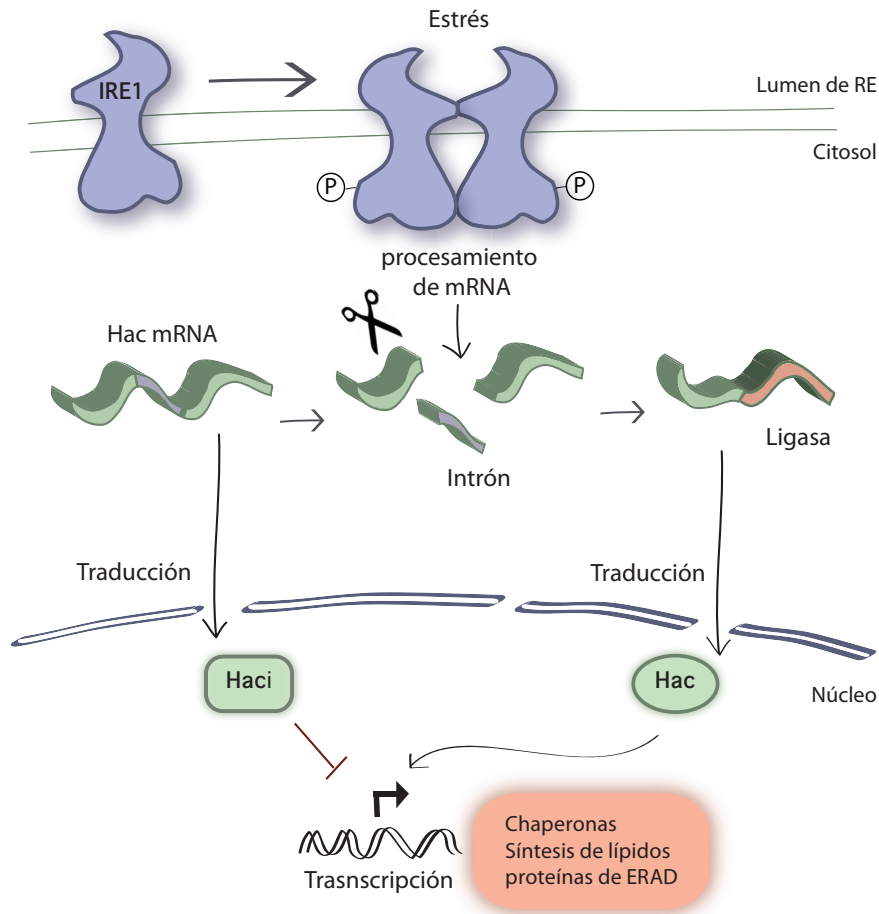


Figura 3 Vía de respuesta a proteínas desdobladas en *S. cerevisiae*
 Ante la acumulación de proteínas desdobladas en el lumen del RE, Ire1p (Inositol-requiring protein-1) se oligomeriza en la membrana del retículo. La trans- autofosforilación en su dominio citosólico de cinasa aumenta la afinidad por nucleótidos, con lo que se activa alostéricamente su actividad de endorribonucleasa. Ire1p media el corte de un pequeño intrón en el mensajero Hac. Los fragmentos del mensajeros son unidos por una ligasa. Con ello, cambia también el marco de lectura. El mensajero de Hac procesado codifica para un activador transcripcional (Hac), mientras que el mensajero no procesado codifica para un inhibidor de la respuesta (Haci,) Adaptado de Ron, 2007²⁴.

Se ha observado que la actividad cinasa de Hog1p y su localización en citoplasma (a diferencia de la actividad nuclear en la respuesta a estrés osmótico) es necesaria para conferir resistencia a la toxicidad de la tunicamicina, pero parece hacerlo por un mecanismo independiente de los elementos de señalización usados en la vía UPR²⁰. Mutantes Δhog , Δpbs y $\Delta ssk1$ son sensibles a tunicamicina comparadas con la cepa silvestre mientras que una mutante $\Delta sho1$ no lo es, sugiriendo que sólo una rama de la vía de HOG está involucrada en el fenotipo de resistencia observado. Se desconoce el mecanismo por el que estas proteínas u otras de la vía pudieran participar en la resistencia a tunicamicina.

Antecedentes

Respuesta a estrés osmótico en *K. lactis*

En el grupo de investigación, se hizo una búsqueda mediante BLAST de genes codificantes para los elementos de ambas ramas de la vía de HOG de *K. lactis*. En las secuencias correspondientes a SLN1, YPD1 y SSK1 se encuentran conservados los sitios necesarios para la reacción de fosfotransferencia. Se generaron mutantes para estos y otros componentes de la vía. Entre los fenotipos destacados, se encontró que las mutantes nulas *sln1* y *ypd1* son viables y ligeramente osmosensibles, cuando en la vía canónica descrita en *S. cerevisiae* dichas mutantes son letales debido a una sobre-activación de Hog1p. Dicha sobre-activación en *S. cerevisiae* ocurre por la acumulación, en las cepas $\Delta sln1$ o $\Delta ypd1$, de la forma no fosforilada de Ssk1p, la cual activa constitutivamente a las MAPKKK Ssk2/22 (Figura 2) y estas a su vez, provocan la activación permanente de Hog1p. El resultado es la producción continua de glicerol lo que finalmente compromete la viabilidad de la célula. La letalidad de las mutantes $\Delta sln1$ o $\Delta ypd1$ (o en mutantes de los residuos críticos de fosforelevo) es suprimida cuando a la vez se eliminan los genes *SSK1*, *SSK2/22*, *PBS2* o *HOG1*²⁵.

Las mutantes nulas en el resto de rama en *K. lactis* tienen fenotipos similares a los observados en *S. cerevisiae* con la excepción de que no se encuentra un homólogo del gen redundante *SSK22*.

La velocidad de crecimiento de las mutantes de *K. lactis* $\Delta sln1$ o $\Delta ypd1$ (de ahora en adelante denominadas Klsln1p y Klypd1p, respectivamente) en KCl 0.75 M es aproximadamente 50% menor que la cepa silvestre (Figura 4), lo que indica que estas proteínas están involucradas en el sistema de fosforelevo.

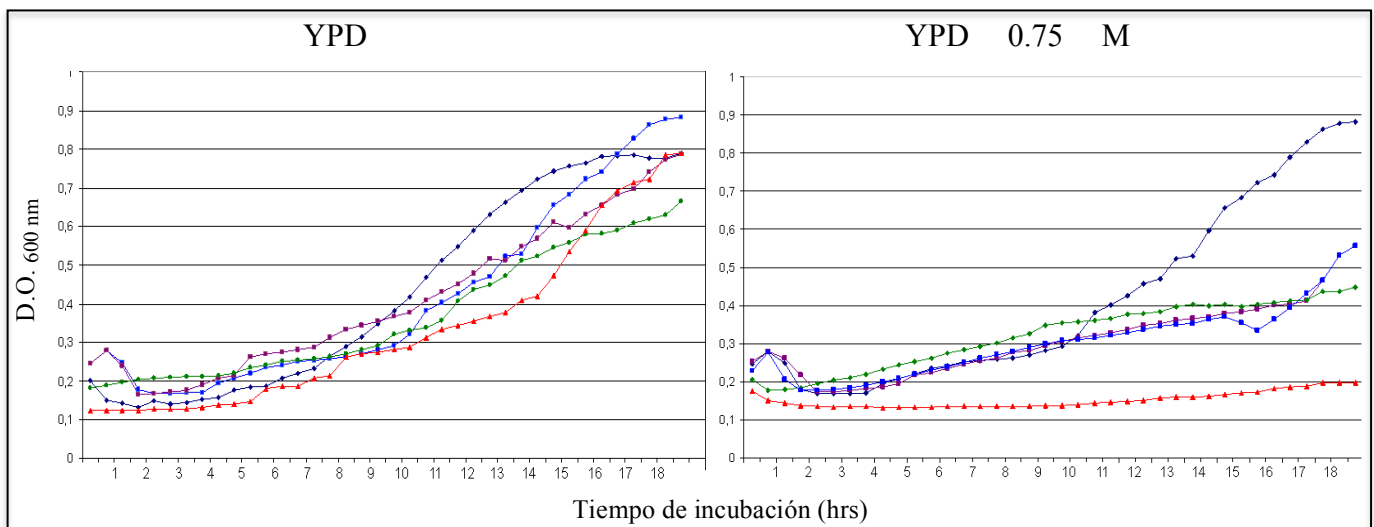


Figura 4 Curvas de crecimiento de mutantes en componentes de la rama SLN1 de *K. lactis*.

Densidad óptica de cultivos medidos en intervalos de una hora de: cepa silvestre MD 2/1 \blacklozenge , $\Delta sln1$ \blacksquare , $\Delta ypd1$ \blacksquare , $\Delta ssk1$ \blacklozenge , $\Delta pbs2$ \blacktriangle , en medio rico (izquierda) y medio rico adicionado con KCl 0.75 M (derecha). Datos no publicados M. Rodríguez.

Actividad de Ssk1

Saito y colaboradores^{26, 27} han propuesto un mecanismo de activación de Ssk2p mediado por Ssk1p en *S. cerevisiae*, (denominadas en este trabajo ScSsk2 y ScSsk1, respectivamente) basado en la capacidad de homodimerización de ScSsk1 según el estado de fosforilación del ácido aspártico 554 en su dominio receptor, esquematizado en la Figura 5. Este dominio de ScSsk1p interacciona con la región amino terminal de ScSsk2, en la región “Ssk1-binding site”, sólo cuando el residuo Asp554 está defosforilado (ScSsk1-OH). Mutantes puntuales en las que se ha sustituido este residuo por otros (como Glu, Gln, Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, His, Pro o Val), resultan en la activación constitutiva de ScSsk2. La activación de ScSsk2 depende también de su autofosforilación, una reacción de tipo intramolecular que permite la actividad de cinasa sobre si misma y sobre Pbs2p. Se asume que la interacción con ScSsk1-OH libera la auto inhibición que ejerce la región amino terminal de ScSsk2 sobre sí misma.

Además, ScSsk1 en su forma fosforilada (ScSsk1-P) tiene un efecto inhibitorio sobre ScSsk1-OH debido a que las moléculas de ScSsk1 se encuentran mayoritariamente en forma dimérica y solamente el homodímero ScSsk1-OH/ScSsk1-OH tiene actividad sobre ScSsk2. De esta manera, se cree que se evita la activación inespecífica de la vía que pudiera generarse por la hidrólisis de algunas moléculas de ScSsk1-P a su forma defosforilada.

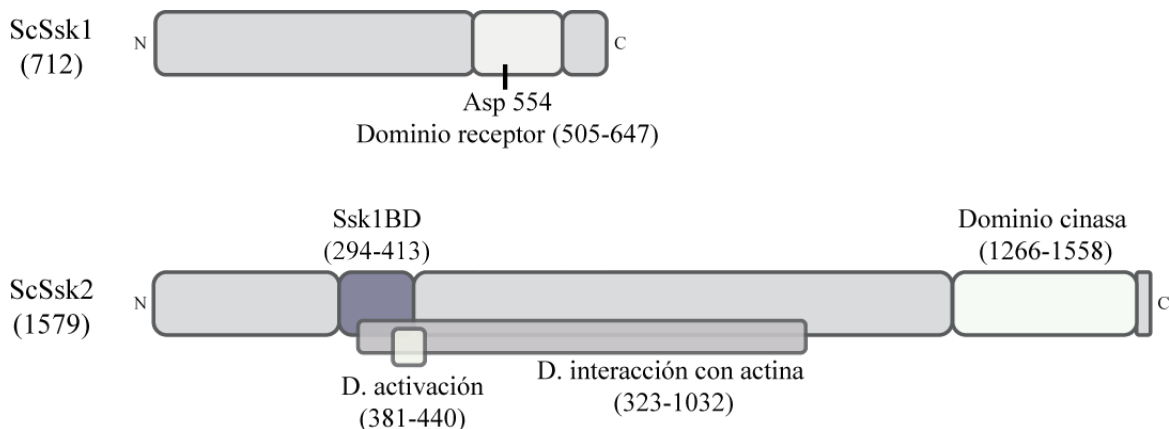


Figura 5. Estructuras de ScSsk1 y ScSsk2

Representación de los dominios identificados en ambas proteínas. Ssk1BD: “Ssk1-binding domain”. Se indican entre paréntesis el número de residuos totales de cada proteína así como la posición de aquellos que forman cada dominio.

Diversidad de Sistemas de Fosfotransferencia eucariontes

Aunque en *S. cerevisiae* el sistema SLN1 regula negativamente la vía de HOG, se conocen otros hongos en los que las cinasas de histidina de la familia de SLN1, u homólogos del mismo gen, se comportan de manera distinta²⁸. Es así que en *Candida albicans* la mutante $\Delta sln1$ es viable y muestra defectos en la velocidad de crecimiento y morfología²⁹. La cepa de *Neurospora crassa* $\Delta os-1$, mutante en una probable cinasa de histidina, es viable e hipersensible a NaCl³⁰. TcsBp, una cinasa de histidina transmembranal del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* complementa la función de ScSln1p, aunque no se ha encontrado un fenotipo distintivo en una mutante $\Delta tcsB$ ³¹. Así mismo, se ha descrito una cinasa de histidina en el patógeno del maíz *Cochliobolus heterostrophus*, denominada Dic1p, que regula de manera positiva la activación de la cinasa homóloga de Hog1p en respuesta a alta osmolaridad y fungicidas³².

No se han estudiado a profundidad estos posibles sistemas de fosfotransferencia o de qué manera afectan a componentes de señalización posteriores. No obstante, su identificación sugiere que el uso de cinasas de histidina y reguladores de respuesta es más heterogéneo de lo descrito en la levadura del pan.

Debido a que en *K. lactis* las mutantes de los componentes del sistema de fosforelevo $\Delta sln1$ y $\Delta ypd1$ son viables, a diferencia de la vía canónica descrita en *S. cerevisiae*, y que muestran cierta sensibilidad a medios hiperosmóticos, la vía de *K. lactis* debe operar de manera diferente en algún proceso dentro de la rama SLN.

Una de las posibles explicaciones al fenotipo no letal y osmosensible de las mutantes $\Delta sln1$, $\Delta ypd1$ en *K. lactis* es que el sistema de fosfotransferencia funciona como regulador positivo en esta levadura. Es decir, que en condiciones normales el sistema de fosforelevo de *K. lactis* se encuentra apagado y ante un estímulo de hiperosmolaridad se active. Esto implicaría que la forma no fosforilada de KlSsk1p es inactiva y que KlSsk1-P es capaz de activar a KlSsk2p.

Hipótesis

Si la actividad de KlSsk1p depende únicamente de su estado de fosforilación y la forma no-fosforilada es inactiva, al expresar KlSsk1p en *S. cerevisiae* se producirá en condiciones iso-osmóticas una forma activa de esta proteína que encenderá el resto de la vía. Bajo la misma suposición, una mutante no fosforilable (KlSsk1-OH) no podrá activarse ante estímulos hiperosmóticos ni generar un fenotipo letal por sobre activación de la cascada de señalización.

De lo anterior, se desprende el siguiente objetivo respecto al estado de activación de KlSsk1:

Objetivo

Por medio de expresión heteróloga, determinar si K1Ssk1p es un homólogo funcional de ScSsk1p y determinar que estado de fosforilación corresponde a su forma activa.

Objetivos Particulares

Para determinar si K1Ssk1 se acopla al sistema de transducción de la vía SLN1 de *S. cerevisiae*, se resolvió expresar esta proteína de manera individual y en conjunto con la cinasa Ssk2 de *K. lactis* (o K1Ssk2), su probable blanco natural. Esto en una cepa de *S. cerevisiae* carente de los genes endógenos *SSK1*, *SSK2*, así como de *SSK22*, (el gen redundante presente en *S. cerevisiae*) y de *STE11*, el gen de la otra MAPKKK capaz de encender la vía. En consecuencia, se establecieron los siguientes objetivos:

- Obtener cepas de *S. cerevisiae* con los fondos genéticos necesarios para la expresión de Ssk1p y Ssk2p de *K. lactis*;
 - $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$
 - $\Delta ssk1\Delta ste11$
 - $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$
- Subclonar en un vector de expresión los genes codificantes para K1Ssk1p en su versión silvestre y la mutante puntual no fosforilable K1Ssk1 Asp444Ala (denominada en adelante K1Ssk1DA).
- Subclonar en un vector de expresión el gen codificante para K1Ssk2p.
- Expresar K1Ssk1 o K1Ssk1DA en *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$ y evaluar la viabilidad y crecimiento en medios hiperosmóticos.
- Expresar K1Ssk1 o K1Ssk1DA junto con K1Ssk2 en *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ y evaluar la viabilidad y crecimiento en medios hiperosmóticos.

Metodología

Medios de cultivo

Medio rico YPD: Extracto de levadura 1%, Bacto-peptona 2%, Glucosa 2%, Agar (medio sólido) 2%.

Medio mínimo SD: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.67%, Glucosa 2%, Agar (medio sólido) 2%.

Suplementación de medio SD con aminoácidos:

Uracilo 20mg/L, L-Histidina HCl 20 mg/mL, L-Metionina 20mg/mL, L-Leucina 100mg/L.

Geneticina 200µg/mL (Gibco)

Nourseotracina (ClonNat) 100µg/mL

Tunicamicina .5 µg/mL

2-Desoxiglucosa 5 mM

Luria Bertani (LB) con ampicilina 50 µg/mL

Cepas

Se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 y BY4742, con el siguiente genotipo:

BY4741 :*MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0*

BY4742: *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0*

Las cepas con mutaciones sencillas de la colección “Saccharomyces Genome Deletion Project” (Open biosystems) contienen una inserción del gen KanMX, que confiere resistencia a geneticina o G418. A partir de ellas se produjeron las demás mutantes utilizadas en este trabajo.

Secuencias de genes utilizadas

Las secuencias con las que se trabajó se obtuvieron de la base de datos “Saccharomyces Genome Database”.

Nombre común	Nombre sistemático	Identificador en Saccharomyces Genome Database	Identificador en GeneBank
Ssk1	YLR006C	S000003996	850692
Ssk2	YNR031C	S000005314	855765
Ssk22	YCR073C	S000000669	850436
Ste11	YLR362W	S000004354	851076

Técnicas de DNA recombinante

La manipulación de ácidos nucleicos como reacciones de restricción, purificación de DNA embebidos en agarosa, ligaciones de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo según procedimientos comúnmente usados³³.

Purificación de DNA

Se purificó el DNA genómico de levaduras rompiendo las células con perlas de vidrio y separación orgánica con fenol-cloroformo³⁴. Brevemente, se centrifugó 1.5mL de un cultivo saturado de células y lavó el botón con agua. Se resuspendió el botón en .2 mL un buffer de Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris pH 8 10 mM y EDTA 1mM. Se adicionó una mezcla en proporción 1:1 de fenol y cloroformo. Se agregaron perlas de vidrio para romper las células en agitación vigorosa por 5 min. Se adicionó .2 mL de agua y separaron las fases por centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos. Se tomó la fase superior y precipitó el DNA con 1mL de etanol al 100% frío. Se eliminó el RNA de las muestras centrifugando y e incubando el botón resuspendido en agua con 30 ng de RNAasa por 5 min a 37°C. Se adiciono 10 µL de acetato de amonio 4 M y un mL de etanol al 100%. Se centrifugaron las muestras, eliminó el sobrenadante y resuspendió el DNA en agua.

Transformación de E.coli

Para la propagación de plásmidos y técnicas de DNA recombinante se utilizó la cepa *E. coli* DH5α, con el método de competencia y transformación descrito por Inoue³⁵. Se utilizaron alícuotas con 100µL de bacterias competentes. Se adicionaron alrededor de 10 ng del DNA a transformar. Una alícuota sin DNA se utilizó como control negativo. Las muestras fueron incubadas 30 minutos en hielo, luego a 42°C por 42 segundos y se adicionó un mL de medio Luria Bertani. Se incubaron en agitación a 37°C por lo menos una hora antes de ser sembradas y esparcidas en placas de medio Luria Bertani sólido, adicionado con ampicilina. Se seleccionaron colonias ampicilina-resistentes luego de un día de incubación.

Transformación de levaduras

Los ensayos de transformación de levaduras se hicieron según el método de acetato de litio³⁶; un cultivo líquido saturado se diluyó 1:20 e incubó en medio rico y agitación a 30°C. Al llegar a una densidad óptica de 0.4-0.6 a 600 nm se lavaron e incubaron con acetato de litio .1M, buffer TE, polietilenglicol 40%, 50 µg esperma de salmón como acarreador y 1 µg del DNA de interés. Las muestras se incubaron a 30°C por 30 minutos luego de los cuales se adicionó 40µL de dimetil sulfóxido y se sometieron a un choque térmico de 42°C por 15 minutos. Después, las muestras se lavaron en agua y sembraron en placas de medio selectivo para células transformantes.

Construcción de mutantes con alelo *ste11* interrumpido (*ste11::nat*)

El gen *STE11* de *S. cerevisiae* se interrumpió con un casete de resistencia a nourseotricina, también llamado Nat, por el método de remplazo de gen en un paso. De esta manera, el segmento cromosomal de *STE11* es reemplazado por el fragmento Nat, después de integrarse por recombinación homóloga. Se diseñaron los adaptadores Ste11FWS_8 y Ste11RVS_10 que contienen una región de homología de 45 bases al gen *STE11* (bases subrayadas) y otra de 19 bases con homología al casete Nat:

Ste11FWD_8

TATTCATATTTACACACATGCATAAAGAGAGACCACTTAATAAACGCCAGATCTGTTTAGCTT

Ste11RVS_10

AAAACCGGTAAATAGCAGATATATTCAATAAATGTCACTAAATATCGACAGCAGTATAGCGACCA

Se amplificó el casete Nat usando como templado el plásmido P4339³⁷ en las siguientes condiciones:

P4339 [0.01 µg/µL], adaptadores 200 ng, dNTPs [10mM], MgCl₂ [1.5 mM]

Ciclos: 94°C 5' / 94°C 1', 60°C 1' 20'', 72°C 2' x 30 ciclos / 72°C 10'

Se purificó el producto y transformó en los fondos mutantes Δ *ssk1* y Δ *ssk1* Δ *ssk2* Δ *ssk22*. Se seleccionaron mutantes en el gen *STE11* por resistencia a nourseotricina 100µg/mL y comprobaron por PCR (ver sección- Obtención de mutantes con alelo *ste11::nat*).

Apareamientos

Para las pruebas de apareamientos se estrió una cepa en parches de alrededor de 2x2 cm sobre YPD. Encima de ésta se estrió un parche con la cepa prueba e incubó por 6 horas a 30°C. Luego, se replicaron en cajas de medio SD suplementado con los aminoácidos necesarios para la selección de diploides indicados en cada experimento y se incubaron las cajas a 30°C de tres a cuatro días hasta detectar el crecimiento de colonias en la placa.

Esporulación de diploides Δ *ssk2*/*SSK2* Δ *ssk22*/*SSK22*

Se aparearon la cepa Δ *ssk2* (Mat a) con la cepa Δ *ssk22* (Mat α) como se describió anteriormente. Se seleccionaron las colonias diploides en Medio SD + Ura, Leu, His. Se estrieron en medio de esporulación e incubaron por 3 días a 30°C y dos días a 4°C. Las colonias segregantes de las esporas obtenidas se probaron en:

YPD G418

SD + Leu, His, Met, Lys

SD + Leu, His, Lys

SD + Leu

Esporulación de diploides $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ssk1$

Se determinó el tipo sexual de la cepa $\Delta ssk2\Delta ssk22$ apareándola con cepas prueba $\Delta ssk1$ tipo “a” y “ α ” y con otra cepa control de *S. cerevisiae* llamada W303, tipo “a”. Luego, se transformó con un plásmido con marcador de auxotrofia de uracilo (pYES2). Así, se obtuvo con un fenotipo temporal Ura^+ , lo que permitió seleccionar diploides en apareamientos con cepas Ura^- .

Un cultivo $\Delta ssk2\Delta ssk22$ se apareó con la cepa $\Delta ssk1$ tipo “a” por seis horas a 30°C y seleccionó la cepa diploide en SD + His, Leu, Met. Se creció en medio líquido YPD por 12 horas, se centrifugó el cultivo y resuspendió en 2.5 ml de medio mínimo de esporulación adicionado con His, Leu y Met al 25%. Se incubó el cultivo por 3 días a 30°C en agitación, 4 días a 4°C sin agitación y dos días más a 30°C en agitación. Se disecaron las esporas de cuatro tétradas y extrajo DNA genómico para su comprobar la presencia de alelos mutantes por PCR.

Disección de tétradas

Se hizo una suspensión de células en 50 μ L de agua desionizada e incubó con 5 μ L con zymolasa (ICN Immunobiologicals) [0.5 mg/ml] por 5 minutos a temperatura ambiente hasta observar al microscopio las ascas parcialmente desintegradas.

Se hizo una estría de este cultivo en una delgada capa de agarosa en agua al 0.7 % montada en un soporte plástico. Se separaron las cuatro esporas de algunas tétradas³⁸ y se colocó el agar sobre una caja de YPD hasta que las esporas germinaran.

Oligonucleótidos de marcos abiertos de lectura de *S. cerevisiae*

Se cuenta con una colección de oligonucleótidos para amplificar los marcos abiertos de lectura de *S. cerevisiae* (“Yeast genepairs Research genetics”). Como se muestra en el esquema, están dirigidos contra la región inmediata río arriba y río abajo de cada gen.



Ssk2, *Ssk22*, *Ste11*

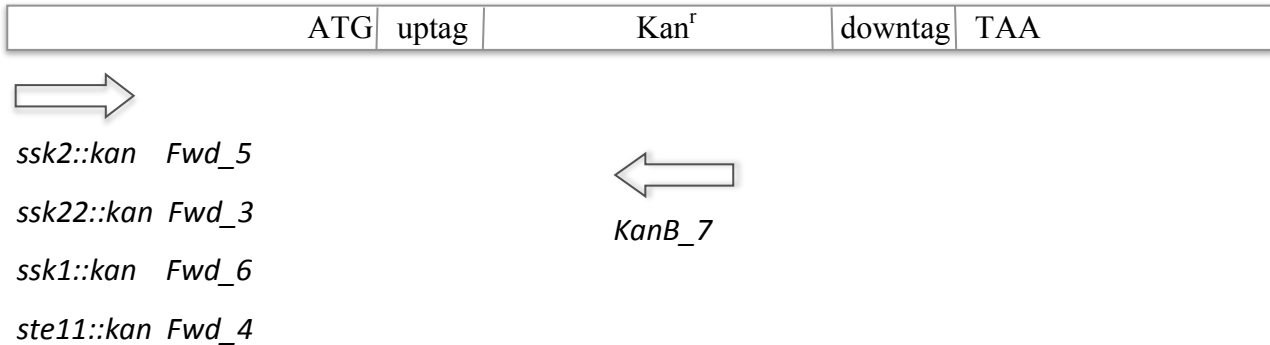
Para comprobar la interrupción en los genes de las mutantes $\Delta ssk2$, $\Delta ste11$ y $\Delta ssk22$ se usaron los juegos de oligos, una mezcla *forward* y *reverse* para cada gen, en reacciones de PCR con DNA genómico tanto de las mutantes como de la cepa silvestre como templado.

Condiciones de PCR usadas: Taq rec invitrogen .5 μ L, $MgCl_2$ [2mM], Oligos [50 nM], dNTPS [10mM].

Ciclos: 92°C 10”/ 92°C 30”’, 55°C 45”’, 72°C 3’15”’ x 35 ciclos / 72°C 5”.

Amplificación de casete KanMX y casete Nat

Para amplificar el casete KanMX o el casete Nat en las mutantes nulas, se hicieron reacciones de PCR usando oligonucleótidos gene-específicos *forward* con una secuencia blanco río arriba del gen de interés y un oligo *reverse* común, homólogo al casete KanMX, como se representa en el siguiente esquema:



Condiciones de PCR usadas: Taq rec invitrogen .5 µL, MgCl₂ [2mM], Oligos [200 ng], dNTPS [10mM].
 Ciclos: 92°C 10'' / 92°C 30'', 56.5 °C 45'', 72°C 3'15'' x 35 ciclos / 72°C 5'

Las secuencias de los oligonucleótidos usados son las siguientes:

Nombre	Secuencia	Tm °C (cálculo con parámetros Allawi)
ssk22FWD_3	TAC GGC CTC TGC CAC GTC	58.5
ste11FWD_4	CAC GGT GCT GGT CTT CGA	56.4
ssk2FWD_5	GCA TAT CCC CCA CGA CTG	54
ssk1FWD_6	CAG CTT TCC GAA GCC CTA A	54
KanB_7	GCA GCG AGG AGC CGT AAT	56.7

Etiqueta histidinas en KISSk2 para subclonación en vector pYES

Se diseñó el siguiente oligonucleótido para amplificar *KISSK2* y etiquetarlo con la marca de seis histidinas.

His_ssk2_11

5' ATATAATTGGTACCATGCATCACCATCACCATCACTCGCAAACAACGATA 3'.

Inserción de KISSk1 en vector pSAL

La secuencia codificadora para KISSk1, fusionada en la región 5' con una porción codificante para 171 aminoácidos del extremo amino de la proteína amarilla fluorescente³⁹, se liberó del plásmido pGEM-Teasy con las enzimas NotI y SmaI. El fragmento resultante fue ligado en el plásmido pSAL, previamente digerido con las mismas enzimas y defosforilado con fosfatasa alcalina para evitar su re ligación.

Inserción de KISsk1 y KISsk1DA en pYX142

Las secuencias codificadoras para KISsk1 y KISskDA, fusionadas a la marca de seis histidinas continuas en el extremo 5', fueron extraídas de los plásmidos pQE30-KISSK1 y pQE30-KISSK1^{D444A}, respectivamente, con las enzimas EcoRI y HindIII. Los fragmentos fueron purificados y ligados en el vector pYX142 (R&D Systems), un vector con origen de replicación tipo centromérico (*CEN*), marcador de auxotrofia a leucina (*LEU2*) y expresión de genes regulada por el promotor constitutivo de la triosa fosfato isomerasa.

Inmunodetección de ScHog1p y ScHog1p fosforilado

Se extrajeron proteínas por el método de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Los cultivos fueron incubados en medio selectivo una noche, crecidos durante 4 horas en medio rico y se ajustaron a una concentración fija por turbidez a 600 nm. Se incubaron por 5 minutos con o sin sal en agitación y 1mL de cada uno fue adicionado con 300µL de TCA al 85%. Posteriormente, se eliminó el TCA de las muestras por centrifugación y se rompieron las células con buffer de lisis (250 mM Tris pH 6.8, 0.5M DTT, 10% SDS, 20% Glicerol 0.5% azul de bromofenol, dilución 1X en 30% de Tris 1.5M pH 8.8). Después, se lisaron con perlas de vidrio en un fragmentador y una incubación de 5 min a 95°C.

Los extractos de proteína total se corrieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE y fueron electrotransferidos a membranas de nylon (Millipore, Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con leche al 9% en PBS y Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween) durante media hora a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo IgG anti-p38 MAPK T180/Y182 de conejo (Cell Signalling Technology) durante una noche a 4°C en agitación suave. Posteriormente se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a HRP (Zymed, South San Francisco, CA). Para revelar la película, las membranas se trataron con sustrato de HRP quimioluminiscente (Millipore).

Pruebas de crecimiento en sal, tunicamicina

Las pruebas de crecimiento por goteo en cajas se hicieron creciendo cultivos crecidos por 16 horas a 30°C en medio selectivo. Para cepas portadoras de pSAL y pYX142 se usó SD+ his, met, ura, lys. Los cultivos se ajustaron a una turbidez de .01 a 600 nm YPD y se crecieron hasta llegar a .04. Se hicieron cuatro o cinco diluciones seriales 1:10 en YPD y se sembraron consecutivamente 5 µL de cada dilución en cajas con los medios a probar. Se incubaron a 30°C por 48 horas.

Resultados

Las ramas SLN y SHO en la vía de HOG son redundantes, ya que ambas pueden estimular la fosforilación de Pbs2p. Consecuentemente, la señalización de Hog1p por estrés osmótico se previene sólo cuando ambas ramas son inhabilitadas. Para poder advertir si la expresión de K1Ssk1 o K1Ssk1DA en *S. cerevisiae* altera fenotipos de sensibilidad en medios hiperosmóticos, se inactivó la rama de SHO mediante mutaciones nulas del alelo *STE11*, la otra MAPKKK activadora de Pbs2p (ver Figura 2).

Se utilizó la colección *Saccharomyces Genome Deletion Project*, cuyas cepas contienen reemplazos de cada ORF por el casete de resistencia a geneticina, para generar las siguientes mutantes:

Δssk1Δste11

Δssk2Δste11

Δssk22Δste11

Δssk2Δssk22Δste11

Δssk2Δssk22

Δssk1Δssk2Δssk22

Δssk1Δssk2Δssk22Δste11

Genotipo de cepas obtenidas

- *Δssk1Δste11* 3 y 6: *his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 ssk1::KanMX ste11::Nat*
- *Δssk2Δste11*: : *MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 ssk2::KanMX ste11::Nat*
- *Δssk22Δste11*: *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 ssk22::KanMX ste11::Nat*
- *Δssk2Δssk22Δste11*: *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ssk2::KanMX ssk22::KanMX ste11::Nat*
- *Δssk1Δssk22* (60C) : *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ssk2::KanMX ssk22::KanMX*
- *Δssk1Δssk2Δssk22* (TM): *MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 ssk2::KanMX ssk22::KanMX ssk1::KanMX*
- *Δssk1Δssk2Δssk22Δste11* (4M) A y C : *MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 ssk2::KanMX ssk22::KanMX ssk1::KanMX ste11::Nat*

Obtención de mutantes con alelo *ste11::nat*

Como se mencionó anteriormente, la inactivación de una rama o la otra de la vía de HOG no genera fenotipos visibles en condiciones hiperosmóticas, por lo tanto es importante generar mutantes que inactiven a las dos ramas. Para esto se interrumpió a la rama de SHO al nivel de la MAPKKK Ste11 ya que esta es la cinasa que se encuentra exactamente arriba de Pbs2, que es el punto de convergencia de la rama SLN y la rama de SHO.

STE11 participa también en la respuesta a feromonas en levaduras, por lo que mutantes en este locus muestran un fenotipo de esterilidad y no es posible usar la segregación meiótica como estrategia de mutación en más de un gen. Por ello, todas las mutantes de *STE11* se hicieron mediante un reemplazo por recombinación homóloga con una construcción del gen Nat, que confiere resistencia a nourseotricina, flanqueado por regiones homólogas al inicio y final del gen.

Se amplificó el gen Nat a partir del plásmido p4339 con los adaptadores que contienen de 45 a 47 bases de homología al gen *ste11* y de 19 a 21 bases homólogos al gen Nat. Para hacer la cuádruple mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$, el producto de alrededor de 1 Kb se usó para transformar el fondo $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ (cuya construcción se describe más adelante) y se seleccionaron mutantes resistentes a geneticina y nourseotricina como se observa en la Figura 6, cuadrante inferior derecho.

De manera similar, se obtuvieron dos clonas $\Delta ssk1\Delta ste11$, $\Delta ssk2\Delta ste11$, $\Delta ssk22\Delta ste11$ y $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ transformando las cepas de cada fondo genético con la construcción *ste11::nat*.

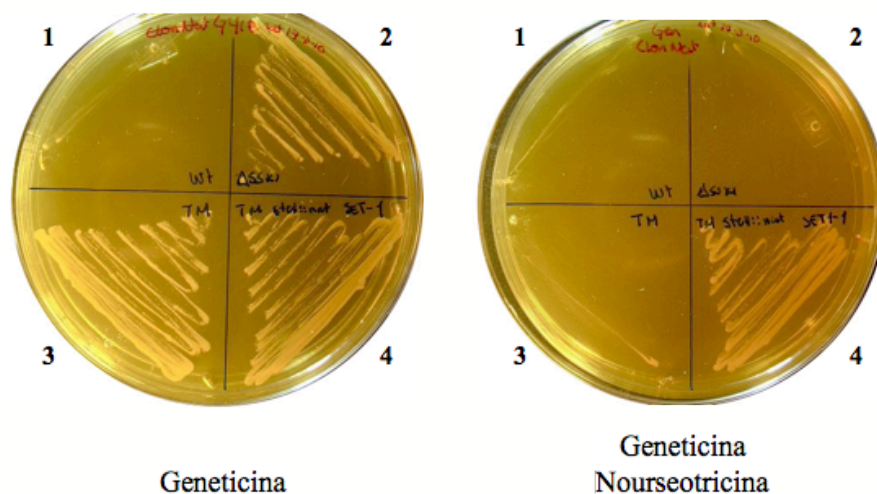


Figura 6 Resistencia a nourseotricina de mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$. Estriado de cepas silvestre (BY), $\Delta ssk1(1)$, $\Delta ssk1(2)$, $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22(3)$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ transformada con el producto de amplificación *ste11::nat* (4). En geneticina [200µg/mL] y geneticina/nourseotricina [100µg/mL].

De las colonias Nat^R obtenidas, se seleccionaron aquellas con fenotipo estéril mediante pruebas de apareamiento. En el caso de las posibles mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ se usaron como prueba las cepas $\Delta ssk1$ tipo “ α ”. La mutante $\Delta ssk1$ tipo “a” no se utilizó como cepa prueba pues no cuenta con el genotipo adecuado para la detección de diploides en caso de aparearse con las mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$. Por ello, se usó la cepa de *S. cerevisiae* W303 tipo “a” como control negativo en la prueba, ya que tiene los marcadores de selección necesarios, pero sexo incompatible con el apareamiento de las mutantes cuádruples. Como se observa en la Figura 7A, las clonas A y C no generan diploides al estar contacto con células del sexo contrario. Se utilizaron esas clonas para experimentos posteriores. De manera similar, se muestra en el panel B los apareamientos de las posibles mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$, usando $\Delta ssk22$ tipo “a” como cepa prueba. Las clonas denominadas 3 y 6 no generan diploides, a diferencia de la cepa silvestre, después de haber sido incubadas con una cepa fértil del sexo contrario.

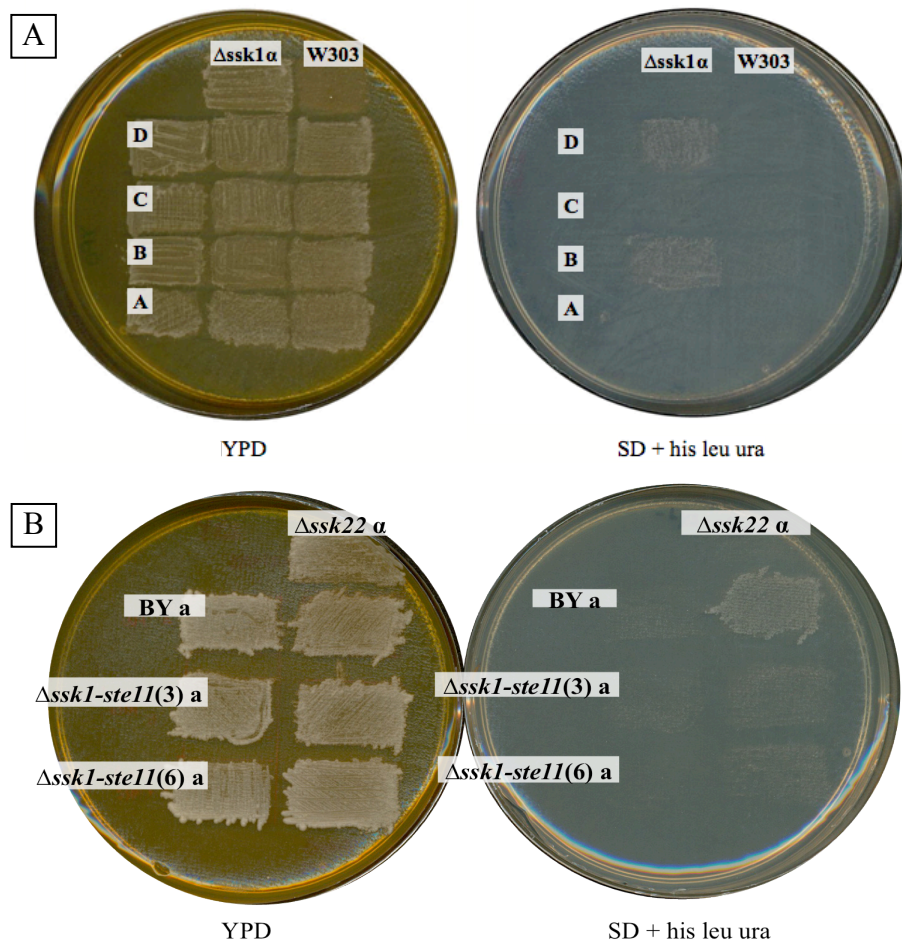


Figura 7 Fenotipo estéril de $\Delta ssk1\Delta ste11$ y cuádruple mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$.

A) Apareamiento en YPD de posibles mutantes *ste11::nat* (columna de parches extrema izquierda) con las cepas de distinto tipo sexual (fila superior) $\Delta ssk1$ “ α ” y W303 “a”. Réplica en medio de selección de diploides SD+ His Leu Ura.

B) Apareamiento de YPD de la cepa silvestre y dos transformantes $\Delta ssk1\Delta ste11::nat$, tipo “a” (columna izquierda) con $\Delta ssk22$ tipo “a” (fila superior). Réplica en SD+ His Leu Ura.

Después de haberse probado el fenotipo estéril de las mutantes de $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$, se verificó que contuvieran el alelo $ste11::nat$ por PCR, utilizando oligos para amplificar el gen interrumpido y los juegos de oligos para amplificar el gen silvestre como control negativo. Con el DNA genómico de la cepa silvestre se amplifica el gen completo *STE11* (Figura 8, carril 1) y no el alelo mutante (carril 3). Tanto en la mutante sencilla $\Delta ste11$ como en las dos clonas cuádruples $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ (carriles 4, 6 y 8, respectivamente) se encuentra el fragmento $ste11::nat$ de aproximadamente 890 pb y no el gen silvestre. Se encontraron los mismos resultados al realizar el experimento sobre las mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$.

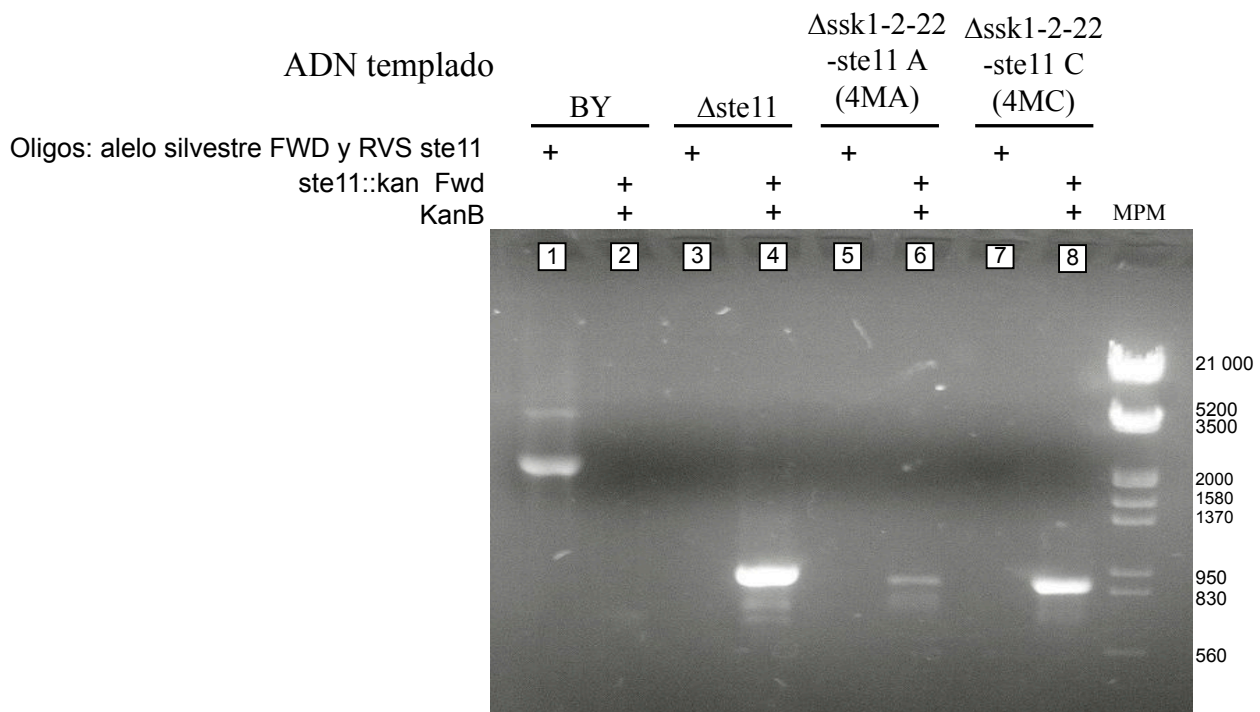


Figura 8 Amplificación de fragmento de casete Nat en mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$.

Gel de agarosa 1% y bromuro de etidio con productos de amplificación de gDNA purificado de la cepa silvestre (BY), la mutante $\Delta ste11$, y dos clonas $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ nourseotracina-resistentes (4MA y 4MC). Se probaron tanto los oligos dirigidos contra el gen silvestre, como $ste11::kan$ FWD y KanB *reverse* para amplificar $ste11$ interrumpido por el casete Nat. Marcador de peso molecular (MPM) en último carril.

Obtención de mutante $\Delta ssk2\Delta ssk22$. Amplificación de alelos silvestres

Para expresar K1Ssk2p de *K. lactis*, se generaron mutantes de *S. cerevisiae* en los genes endógenos *SSK2* y *SSK22*, las dos MAPKKK capaces de activar a Pbs2p en la rama SLN. Este fondo genético se utilizó además para generar las cepas $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$. En dichas mutantes se podría expresar de manera heteróloga a las dos proteínas de K1Ssk1 y K1Ssk2 así como determinar si los efectos de expresión de K1Ssk1 se generan mediante la señalización por ScSsk2/22p.

$\Delta ssk2\Delta ssk22$ se obtuvo por cruce de las dos mutantes sencillas y selección de esporas segregantes, de acuerdo a la estrategia descrita en métodos. Contando con los oligonucleótidos para amplificar los genes silvestres de *S. cerevisiae* se corroboró por PCR que las mutantes sencillas no tuviesen los alelos *SSK2* y *SSK22* y la doble mutante careciera de ambos.

Los juegos de oligos amplifican específicamente *SSK2* y *SSK22* pues con el DNA de la cepa silvestre como templado se observan amplicones de los tamaños esperados para *SSK2* (Figura 9, carril 3), *SSK22* (carril 2) o ambos (carril 4). Se verificó que los amplificados correspondieran a *SSK2* y *SSK22* digiriéndolos con *Pst1* (datos no mostrados). Así mismo, se observa en la misma figura que con la cepa $\Delta ssk2$ sólo se obtiene el amplicón de *SSK22* (carril 6) y con la cepa $\Delta ssk22$ solo se obtiene el que corresponde a *SSK2* (carril 8).

Las segregantes de la cruce $\Delta ssk2$ con $\Delta ssk22$ 60C y 54C, en las que no se detectan amplicones de ninguno de los dos genes silvestres (carriles 10 y 13 respectivamente), fueron seleccionadas para su posterior análisis.

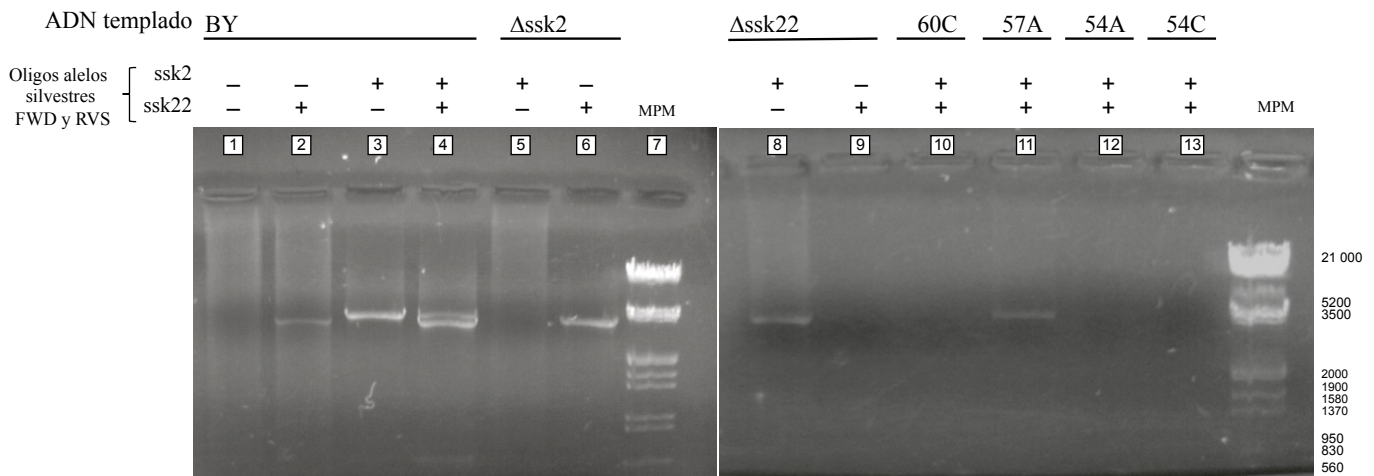


Figura 9 Amplificación de genes silvestres *SSK2* y *SSK22*.

Gel de agarosa 1% de productos de PCR con juegos de oligonucleótidos *forward* y *reverse* (FWD y RVS, respectivamente) para amplificar los genes silvestres *SSK2* (4.74 kb) y/o *SSK22* (3.99 kb). DNA templado extraído de: BY (cepa silvestre BY 4743), mutante sencilla $\Delta ssk2$, mutante sencilla $\Delta ssk22$ y cuatro clonas segregantes de la cruce $\Delta ssk2 \times \Delta ssk22$ denominadas 60C, 57A, 54A y 54C.

Determinación de sexo de mutante $\Delta ssk2\Delta ssk22$

La construcción de la triple mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ se hizo por cruzamiento de las cepas $\Delta ssk2\Delta ssk22$ con $\Delta ssk1$. Para esto, se determinó el tipo sexual de la doble mutante, se apareó en medio rico y se seleccionaron diploides en medio mínimo suplementado con His, Leu, Met. Se seleccionaron segregantes meióticas de esta cruce y finalmente también se comprobaron por PCR diagnóstico. En la Figura 10 se puede ver la prueba de apareamiento de la doble mutante. Las cepas parentales no crecen en medio selectivo para diploides y sólo crecieron parches en este medio cuando se sembró $\Delta ssk2\Delta ssk22$ junto con $\Delta ssk1$ tipo “a” (Figura 10, panel B, parche 1), por lo que el tipo sexual de $\Delta ssk2\Delta ssk22$ es “ α ”. Este mismo parche fue utilizado para incubar el cultivo en medio de esporulación, disecar las esporas y buscar cepas con los tres genes interrumpidos.

Para corroborar el sexo de la doble mutante, se probó también la capacidad de apareamiento con otra cepa de *S. cerevisiae*, la cepa W303 de tipo sexual “a” (imágenes no mostradas).

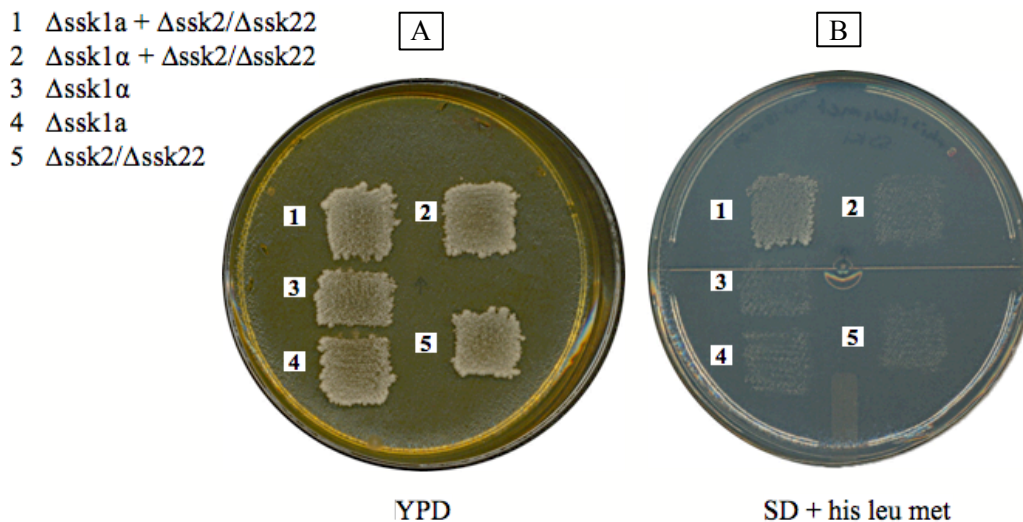


Figura 10 Apareamiento de $\Delta ssk2\Delta ssk22$ con cepas prueba.

Estriado en parches de cepas individuales (3, 4 y 5) o parches de dos cepas sobreimpuestas (1 y 2) en YPD (panel A). Réplica en medio de selección de diploides SD + His, Leu, Met. (Panel B).

Comprobación de mutantes $\Delta ssk2\Delta ssk22$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$. Amplificación de alelos interrumpidos con KanMX

Se hizo una búsqueda de triples mutantes entre las esporas segregantes de la cruce $\Delta ssk2\Delta ssk22$ con $\Delta ssk1$ mediante PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos contra regiones de hasta 100 bases río arriba de los marcos abiertos de lectura de *SSK1*, *SSK2*, *SSK22* y *STE11*. Se utilizó un oligo en dirección reversa en común, KanB, que se une al promotor TEF de los casetes KanMX y Nat. De esta manera, se obtienen amplificadores específicos para cada gen solamente cuando están interrumpidos con el inserto KanMX o Nat, como se esquematiza en la Figura 9A.

Los oligos para alelos silvestres fueron diseñados para amplificar los marcos abiertos de lectura silvestre⁴⁰, por lo que al usarlos con DNA de la triple mutante como templado, se esperaba que no generaran ningún amplificado (Figura 11B).

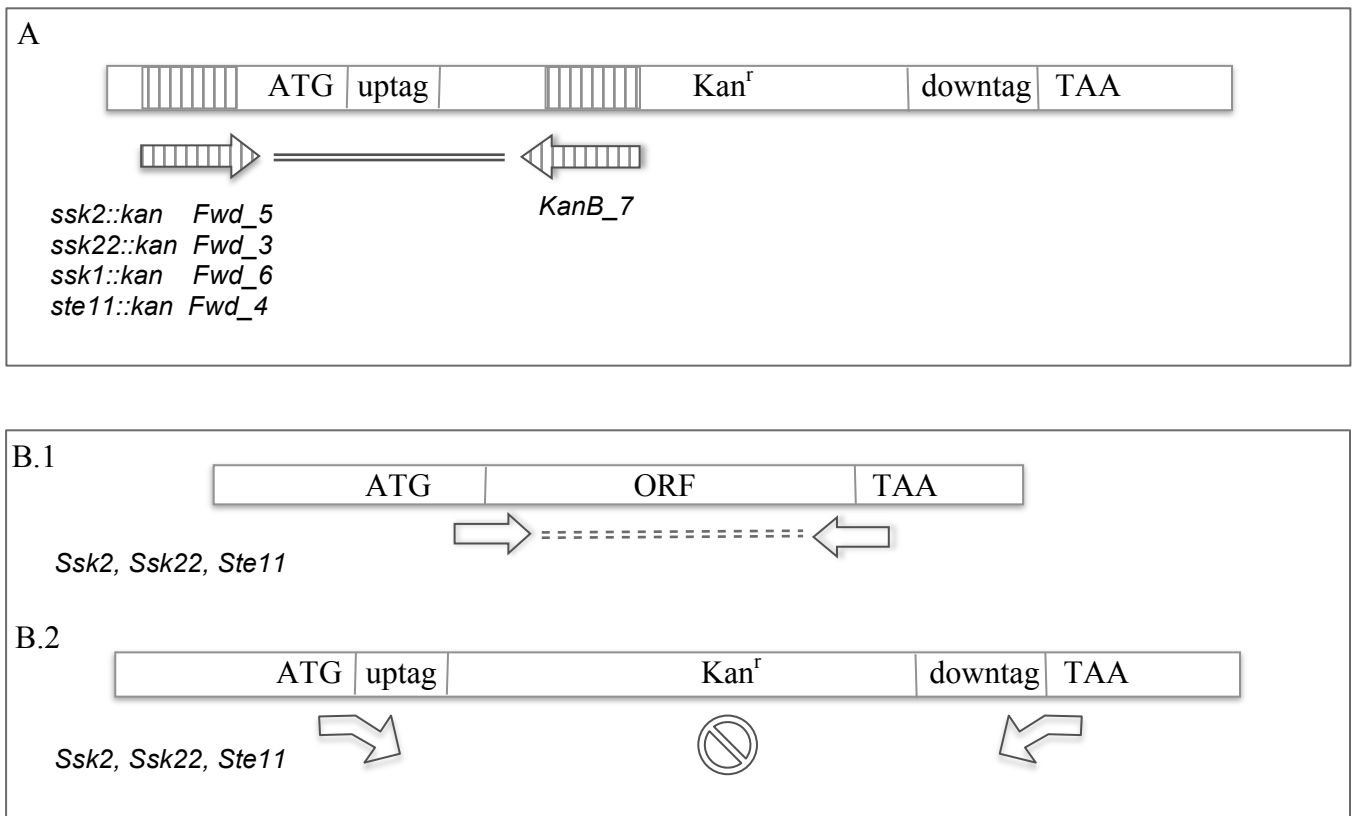


Figura 11 Estrategia de comprobación de alelos mutantes.

A. Utilización de oligos para amplificar fragmentos de genes específicos interrumpidos con el casete Kan, que contienen además secuencias de marcaje denominadas *uptag* y *owntag*. Oligos *forward* (fwd) homólogos a la región río arriba del gen de interés y oligo *reverse* con homología a la secuencia del casete Kan.

B1. Juegos de oligos (*forward* y *reverse*) para amplificar marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes silvestres en su totalidad. Con ellos no es posible amplificar aquellos que han sido sustituidos con el casete Kan (B.2).

Usando el DNA genómico de una de las cepas segregantes como templado, se hicieron reacciones de PCR con los dos tipos de oligos; los pares de la colección *Yeast genepairs Research genetics* para amplificar los genes silvestres, y combinaciones de los oligos diseñados para amplificar la región promotora de KanMX. Como se puede ver en el gel de la Figura 12 (carriles 1-4), no se obtuvieron amplicones cuando se usaron los pares de oligos para cualquiera de los genes *SSK1*, *SSK2* o *SSK22* en su versión silvestre. En cambio, se observan amplicones de los tamaños esperados para las regiones río arriba de *ssk1* (carril 7), *ssk2* (carriles 5-7) y *ssk22* (carriles 6-7), todos ellos contiguos al promotor TEF del gen KanMX.

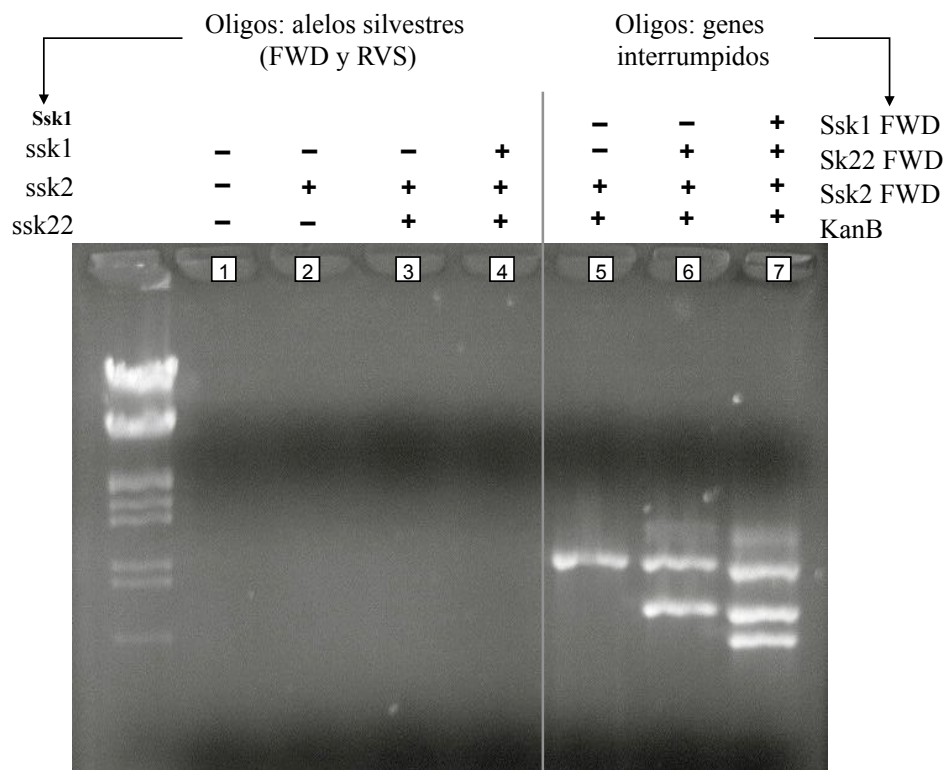


Figura 12 Amplificación de genes interrumpidos con KanMX en triple mutante $\Delta ssk1-2-22$.

PCR a partir de DNA genómico de mutante $\Delta ssk1-2-22$. Carriles 1 a 4: Juegos de oligos *forward* y *reverse* para genes *SSK1*, *SSK2* y *SSK22*.

Carriles 5 a 7: Oligo KanB *reverse* más oligos *forward* *ssk2*, *ssk22* y *ssk1*. Tamaños esperados para *ssk1::KanMX* (480pb), *ssk2::KanMX* (900pb) y *ssk22::KanMX* (615pb).

Construcción de pSAL-KISsk1

Para poder expresar la proteína Ssk1p de *K. lactis*, se usó inicialmente el plásmido pSAL, ya que contiene un promotor inducible por cobre; esto permitiría modular la expresión de KISsk1 y su versión no fosforilable KISsk1DA en las distintas mutantes obtenidas.

La secuencia codificante para *KISSK1* fusionada en su extremo amino a una porción de la proteína amarilla fluorescente se subclonó en pSAL de acuerdo a lo descrito en los métodos. La construcción resultante fue comprobada, en comparación con el plásmido vacío, con los patrones de digestión que se muestran en la Figura 13.

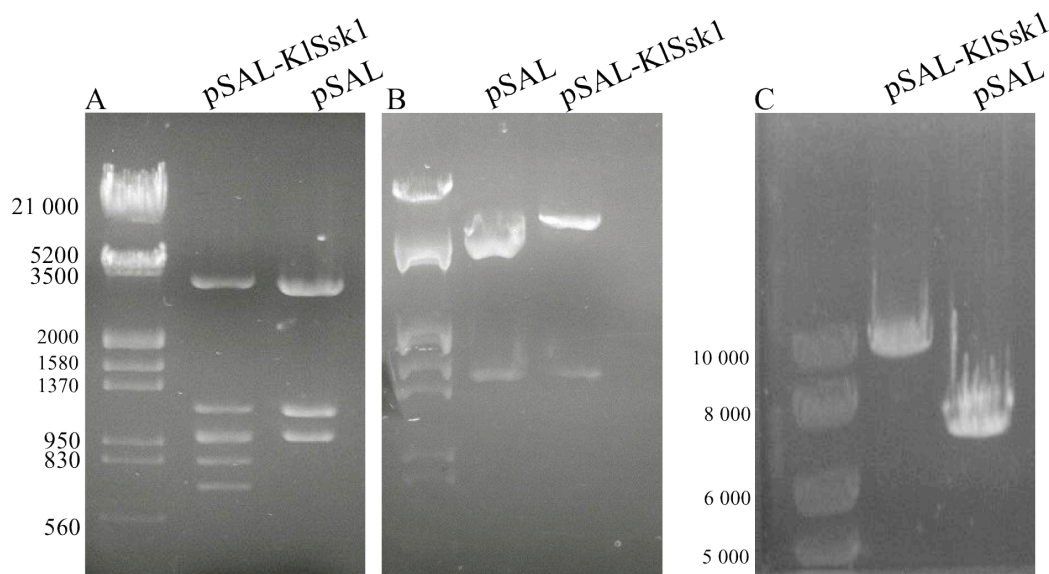


Figura 13 Patrón de digestión de la construcción pSAL-KISsk1

Gel de agarosa con los productos de digestión de pSAL-KISsk1 y el plásmido vacío con:

A) HincII, que libera fragmento interno de *Kl.ssk1* de ~860 pb

B) Asp718/HindII. Tamaño esperado de plásmido vacío: 1.5 y 5.13 Kbs. Para pSAL-KISsk1, 1.5 y 7.6 Kbs.

C) Linearización con SmaI. Tamaños esperados :pSAL, 6.63Kbs. pSAL-KISsk1, 9.90 Kbs.

Expresión de pSAL-KISsk1 en *S. cerevisiae* Δ ssk1 Δ ste11

Al transformar la mutante sencilla Δ ssk1 con el plásmido pSAL-KISsk1 y probar su capacidad de crecimiento en sal, no se observa ninguna diferencia entre la mutante sin transformar, transformada con el plásmido vacío o el plásmido con el inserto (Figura 14, líneas 2 a 4).

Los mismos plásmidos se usaron para transformar dos clonas Δ ssk1 Δ ste11 que se obtuvieron de dos transformantes distintas con el fragmento *ste11::nat* (se muestran resultados de la clona 3). De manera similar a la mutante cuádruple antes mostrada, las mutantes Δ ssk1 Δ ste11 presentan una fuerte sensibilidad a KCl, pues careen de la HK ScSsk1p y de la MAPKKK ScSte11p, por la que se transmite la señal desde la rama de SHO. En estas mutantes es posible detectar cambios de tolerancia a sal debidos a la presencia o ausencia de las variantes de KISsk1p.

En la Figura 14 (línea 6) se observa que la cepa que tiene la construcción KISsk1 crece en KCl de manera intermedia entre la misma cepa con el plásmido vacío (línea 5) y la levadura silvestre (línea 1). Esto sugiere que la proteína Ssk1p de *K. lactis* unida al fragmento amino la proteína amarilla fluorescente complementa parcialmente a la proteína endógena de *S. cerevisiae*. En el panel B de la misma figura se muestra como control el crecimiento de Δ pbs2, una mutante de la vía típicamente sensible a estrés osmótico.

La expresión de secuencias clonadas en el plásmido pSAL dependen del promotor del gen CUP1 inducible por cobre en el medio ⁴¹. Sin embargo el crecimiento de todas las cepas fue el mismo en cultivos crecidos y sembrados con cobre, que sin él. Se probaron concentraciones crecientes de cobre, 100, 200 o 500 μ M CuSO₄ y variaron las condiciones de inducción entre medio mínimo suplementado o medio rico, obteniendo los mismos resultados en todos los casos (datos no mostrados).

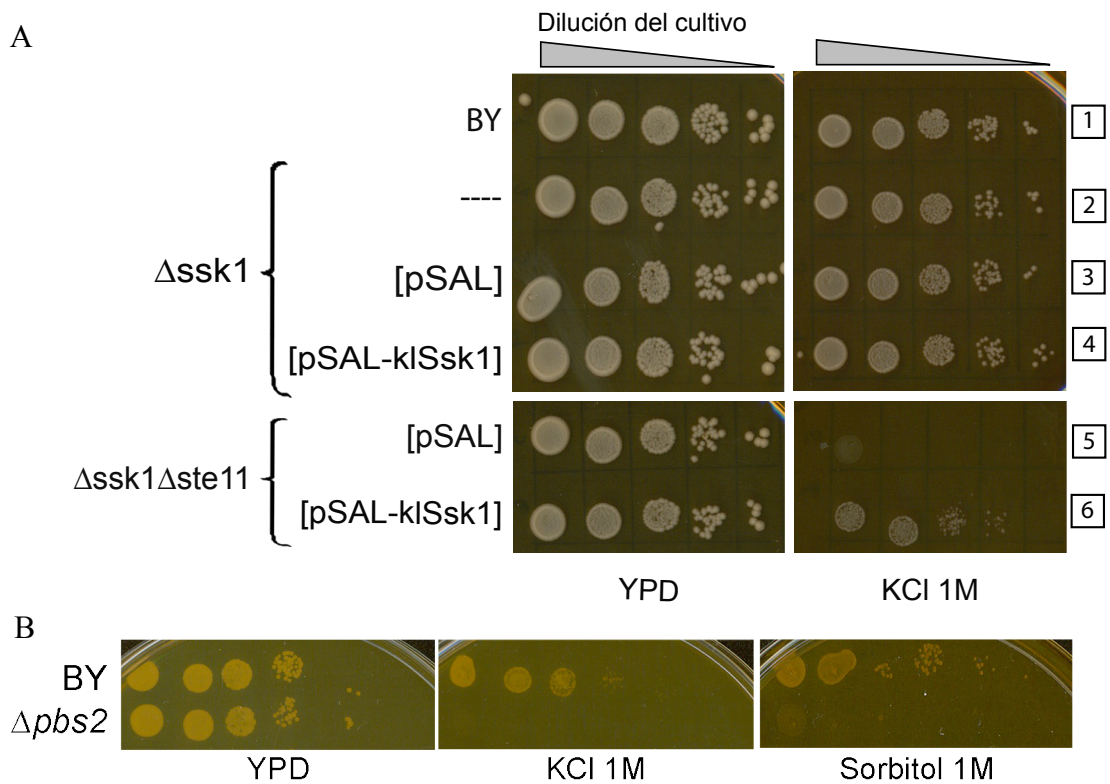


Figura 14 Complementación de KISsk1 en mutantes *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$. Crecimiento en goteo con diluciones seriales de los cultivos (factor 1:10).

A) La cepa silvestre y transformantes, ya sea con el plásmido vacío o KISsk1, en fondos $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$ (clona 3). Cajas de medio rico YPD y YPD con KCl.

B) Crecimiento en goteo de la cepa silvestre (BY) y la mutante nula de la cinasa Pbs2p, en YPD y dos medios hiperosmóticos: KCl y Sorbitol 1M.

Expresión de KISsk1 en $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$

La misma construcción pSAL-KISsk1, o el plásmido vacío, se usaron para transformar dos clonas $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$. Se crecieron cultivos en medio selectivo, se llevaron a fase logarítmica de crecimiento en medio rico y se gotearon concentraciones seriales de cultivo en medio YPD y YPD adicionado con cloruro de potasio. De nuevo, se puede observar en la cuarta línea de goteos de la Figura 15 (línea 4), la tolerancia a medios con sal en las cepas $\Delta ssk1\Delta ste11$ [pSAL-KISsk1]. Sin embargo, en las mutantes cuádruples no se recupera el fenotipo tolerante a sal en cultivos transformados con dicha construcción ni con el plásmido vacío (Figura 15, línea 6), indicando que la capacidad de crecer en sal, conferida por KISsk1, involucra a las proteínas ScSsk2p y/o ScSsk22p.

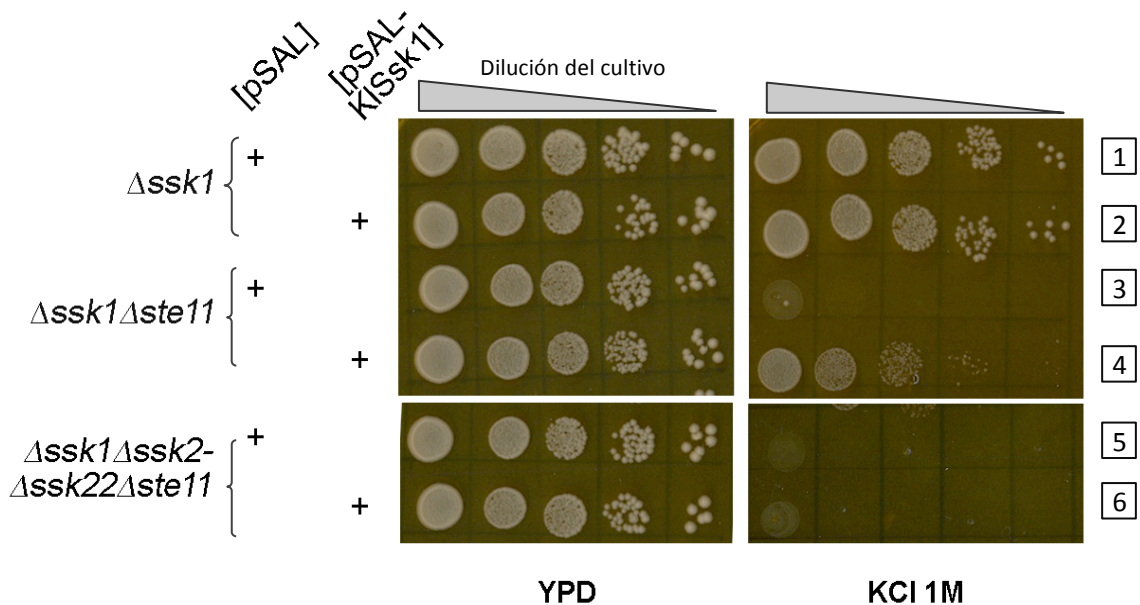


Figura 15 Reversión a fenotipo sensible por expresión de KISsk1 en fondo $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$
Crecimiento en goteo de mutante sencilla $\Delta ssk1$, $\Delta ssk1\Delta ste11$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ transformadas con el plásmido vacío pSAL o la construcción pSAL-KISsk1. Goteos en medio YPD, YPD + KCl 1M.

Expresión de pYX142-KISsk1 y mutante puntual pYX142-KISsk1DA

Como se mencionó anteriormente, se observó complementación de fenotipos sensibles en medios no adicionados con cobre como agente inductor de expresión en el vector pSAL (sección: Expresión de pSAL-KISsk1 en *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$). Esto sugiere una expresión constitutiva del gen clonado en dicho vector. Dada esta irregularidad y la posibilidad encontrar un efecto tóxico por la expresión de la versión mutante KISsk1DA, se continuaron los experimentos de expresión con secuencias clonadas en pYX142 (*CEN*, *LEU2*, promotor de la enzima triosa fosfato isomerasa) según lo descrito en métodos. Aunque en este plásmido hay una expresión continúa por el promotor de la triosa fosfato isomerasa, existe sólo una copia del gen a transcribirse en las células, pues el vector pYX142 tiene un origen de replicación centromérico, a diferencia de pSAL que es de tipo multicopia.

Dos clones de cada cepa $\Delta ssk1$, $\Delta ssk1\Delta ste11$, $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ fueron transformadas con el plásmido vacío o las construcciones [pYX142-KISsk1] o [pYX142-KISsk1DA] (se muestra una de las clones de cada fondo en la Figura 16). Al expresar KISsk1 en $\Delta ssk1\Delta ste11$, se reproduce el fenotipo de complementación observado en experimentos con el otro vector de expresión; las colonias estriadas que contienen el plásmido pYX142-KISsk1 crecen en KCl tan bien como en medio YPD solo (Figura 16, panel B, recuadro rojo), a diferencia de la cepa que contiene el plásmido vacío.

Al igual que con los resultados obtenidos usando el vector pSAL, en las mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ se pierde el fenómeno de complementación conferido por KISsk1 (Figura 16, panel C), indicando que son necesarias las proteínas ScSsk2p o ScSsk22p para responder al estímulo de estrés hiperosmótico.

Contrario a lo descrito en una mutación equivalente en *S. cerevisiae* *ScsSk1DA*, las células donde se expresa KISsk1DA no solo crecen adecuadamente en el medio rico YPD, sino que también se complementa la sensibilidad en medio adicionado con sal y con sorbitol. En la Figura 17 se puede ver que en las cepas $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$ transformadas con pYX142-KISsk1DA, no disminuye el crecimiento en comparación con aquellas que no tienen dicho plásmido (segunda columna de cada panel, en medio YPD). Así mismo, la disminución de crecimiento de $\Delta ssk1\Delta ste11$ [pYX142] conforme aumenta la concentración de osmolitos se compensa cuando se encuentra en esta mutante la construcción pYX142-KISsk1DA ($\Delta ssk1\Delta ste11$, columnas 4, 6 y 8 en paneles A y B). Cabe mencionar que los defectos de crecimiento detectados con KCl no se deben a posibles efectos de fuerza iónica en componentes celulares generales, sino a alteraciones en la vía de HOG, ya que se observa el mismo fenómeno de sensibilidad y complementación usando como osmolito el azúcar sorbitol.

Estos resultados indican que la versión no fosforilable de K1Ssk1 probablemente no sobre active la vía de HOG y que esta forma de la proteína mantiene su actividad como transductora de la señal a través de Ssk2/22p ante el estímulo de alta osmolaridad extracelular.

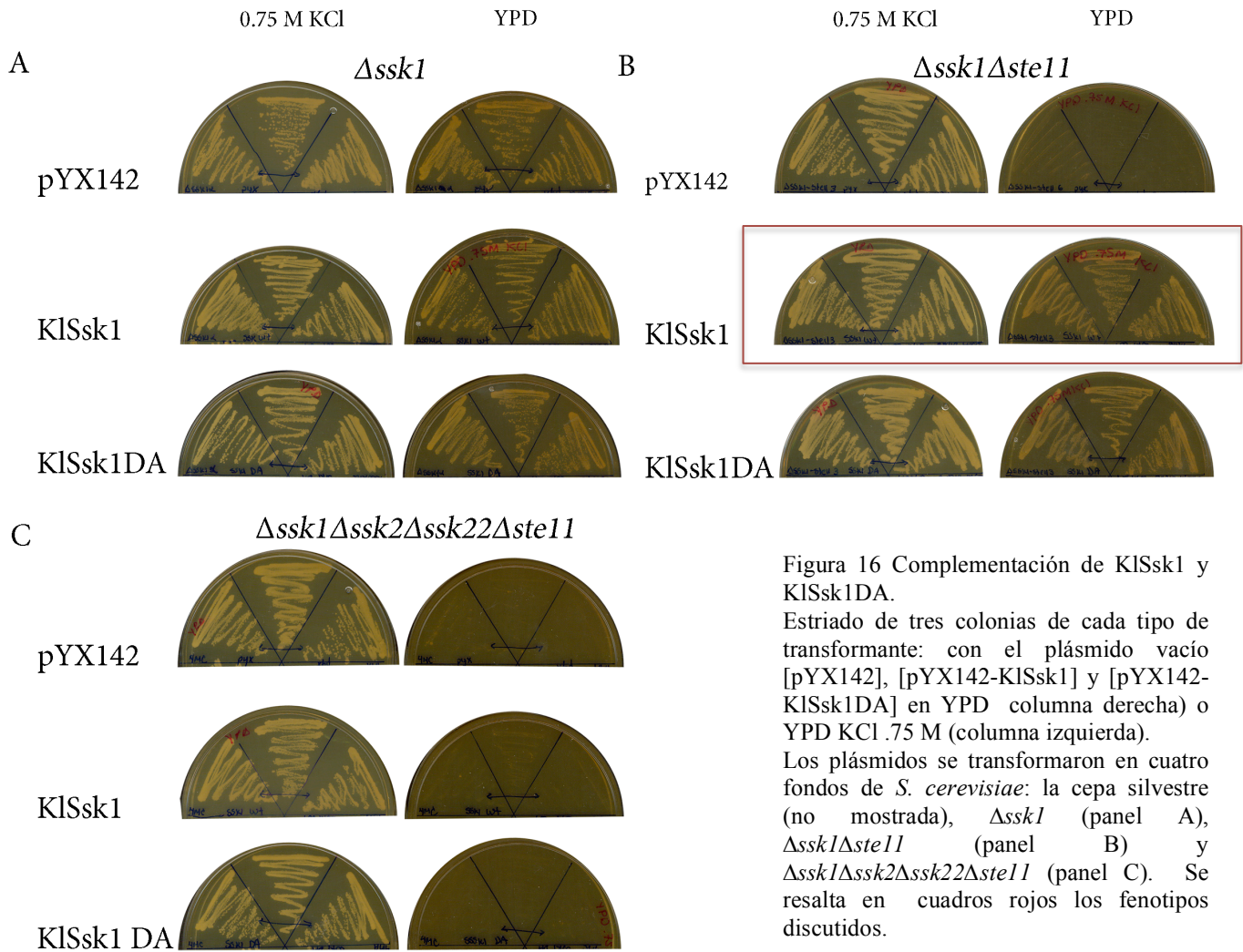


Figura 16 Complementación de K1Ssk1 y K1Ssk1DA.

Estriado de tres colonias de cada tipo de transformante: con el plásmido vacío [pYX142], [pYX142-K1Ssk1] y [pYX142-K1Ssk1DA] en YPD columna derecha) o YPD KCl .75 M (columna izquierda).

Los plásmidos se transformaron en cuatro fondos de *S. cerevisiae*: la cepa silvestre (no mostrada), $\Delta ssk1$ (panel A), $\Delta ssk1\Delta ste11$ (panel B) y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ (panel C). Se resalta en cuadros rojos los fenotipos discutidos.

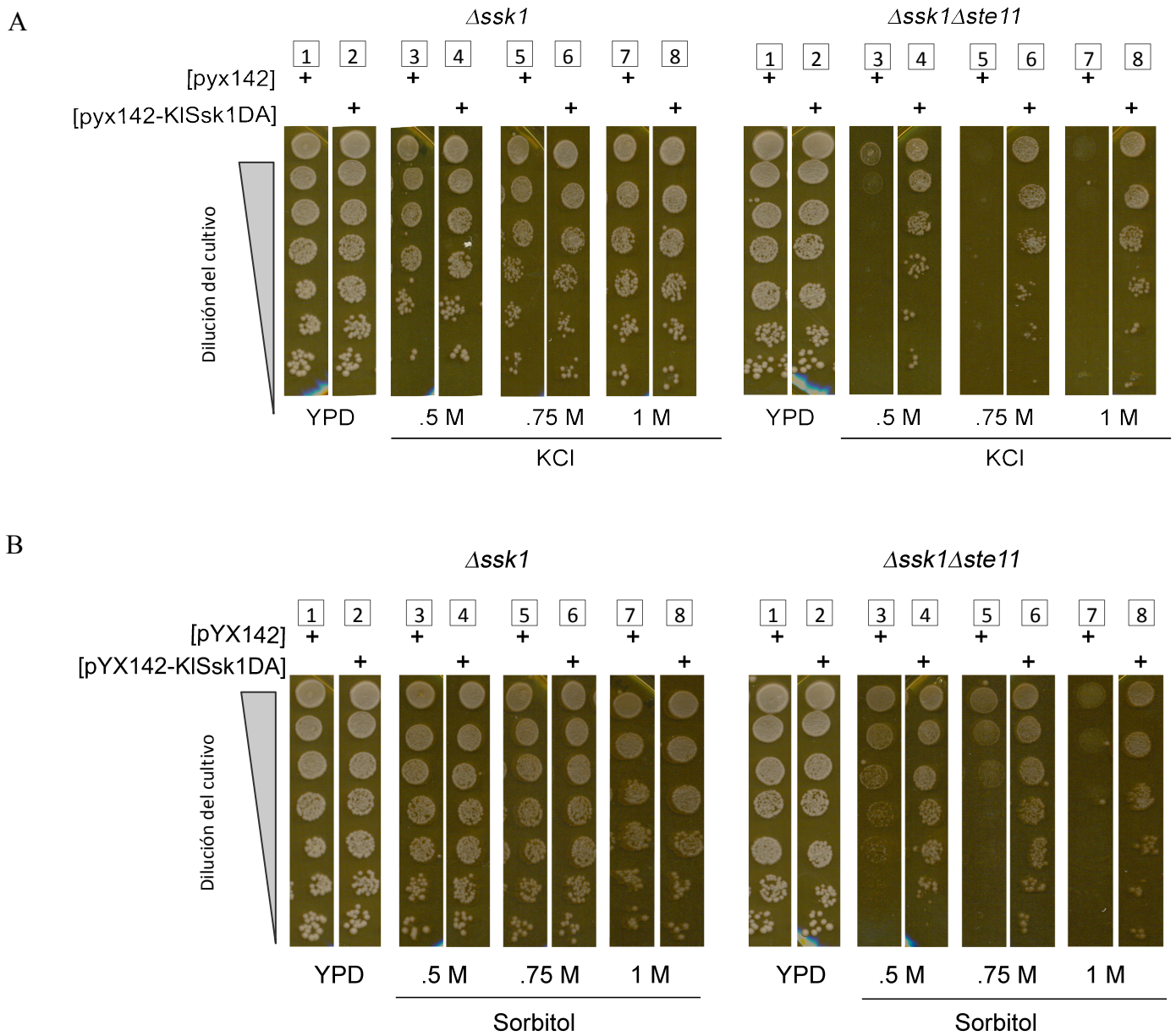


Figura 17 Complementación fenotípica en mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$ por expresión de KISsk1DA. Pruebas de crecimiento en gota de dos cepas, $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$, transformadas con el plásmido vacío pYX142 o la construcción en la que se expresa constitutivamente la mutante no fosforilable, pYX142-KISsk1DA. Goteo de diluciones seriales en YPD y tres concentraciones de A) Cloruro de potasio y B) Sorbitol.

Expresión de ScSsk1 y ScSsk1DA

En cuanto a la caracterización de mutantes en el residuo receptor de Ssk1p, sólo se han reportado estudios en la proteína de *S. cerevisiae*^{9, 20, 21, 22}. Además, los experimentos de expresión descritos fueron realizados sobre un fondo genético distinto a los de este trabajo. Por ello, en el laboratorio se quiso evaluar el efecto de la expresión de Ssk1Asp554Ala (ScSsk1DA) de *S. cerevisiae*, en contraste con KISsk1DA, la mutante equivalente del homólogo en *K. lactis*. En la proteína ScSsk1DA se sustituyó el ácido aspártico receptor de fosfatos de la posición 554 por el residuo alanina.

Expresar la proteína silvestre ScSsk1 en *S. cerevisiae* $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$, no altera el crecimiento en medios iso-osmóticos, como se observa en la Figura 18A (panel derecho, líneas 4 y 8). Según lo esperado, al inducirla en el fondo $\Delta ssk1\Delta ste11$ se recupera el fenotipo resistente a sal, lo que se muestra en la Figura 18B (panel derecho, línea 8).

Por otro lado, la inducción de ScSsk1DA no tiene un efecto letal en las mutantes $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$, aunque sí parece disminuir el crecimiento en condiciones normales (Figura 18A, panel derecho, líneas 5 y 9). Además, su expresión no complementa el fenotipo osmosensible en el fondo $\Delta ssk1\Delta ste11$ (panel derecho, línea 9). Esto indica que la mutante ScSsk1DA probablemente activa la vía en ausencia de un estímulo hiperosmótico, generando cierta toxicidad por lo que los cultivos no crecen como aquellos donde se encuentra la versión silvestre. Sin embargo, esto no genera un efecto totalmente deletéreo en las células, como se ha descrito respecto a su expresión en otras mutantes de la vía.

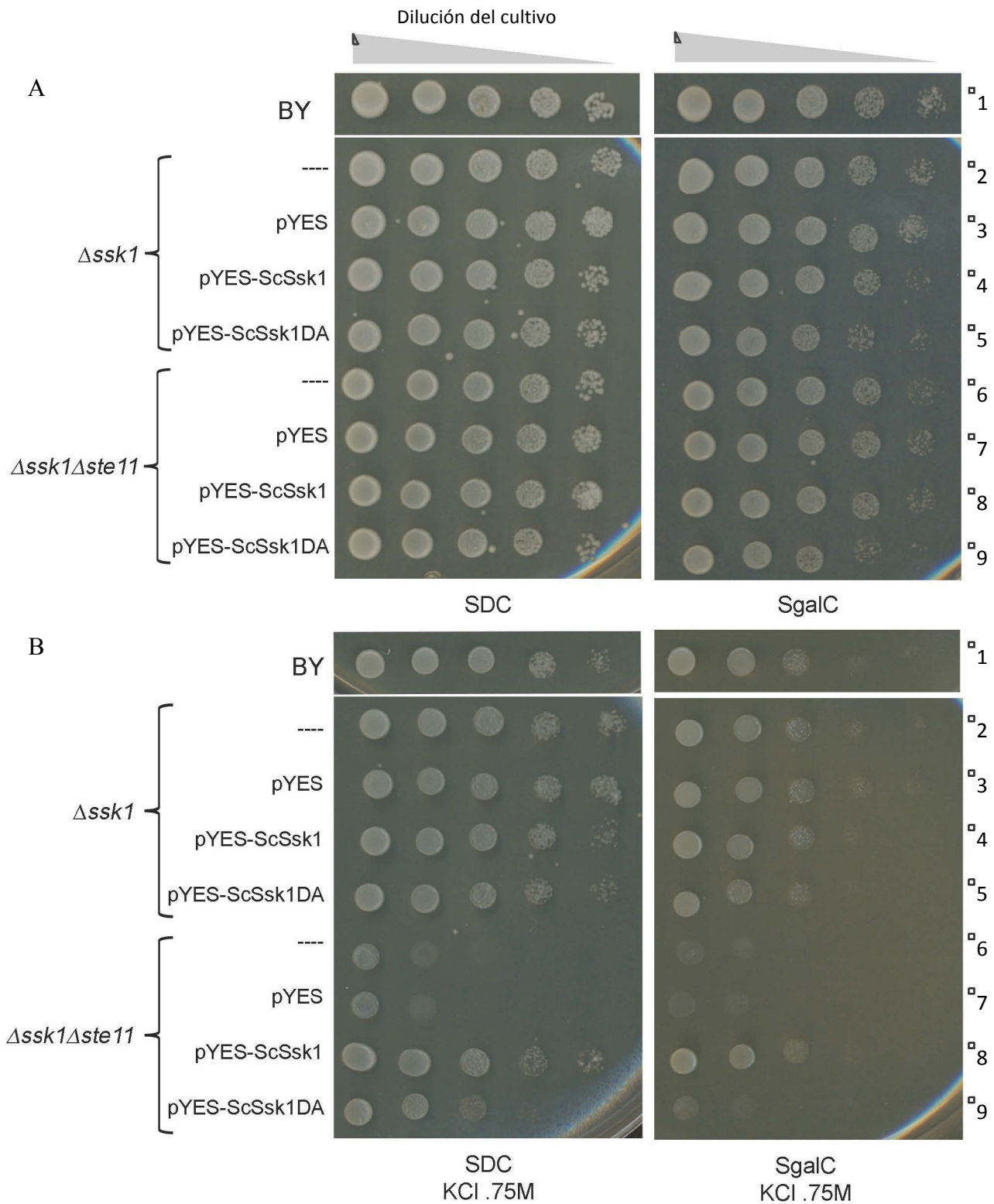


Figura 18 Expresión de las proteínas de *S. cerevisiae* ScSsk1 y la mutante no fosforilable equivalente, ScSsk1DA. Crecimiento de las mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$ transformadas con la secuencia codificante para *SSK1* de *S. cerevisiae* (ScSsk1) y la mutante puntual *SSK1*Asp554Ala (ScSsk1DA) en el plásmido pYES. Como controles: la cepa silvestre (BY), mutantes sin transformar (---) y transformadas con el plásmido vacío (pYES). Los cultivos se sembraron en A) medio mínimo complementado con los aminoácidos necesarios (SDC) y medio con galactosa como agente inductor (SgalC). B) SDC y SgalC adicionados con KCl .75M. Crecimiento por 24 horas. Imágenes proporcionadas por Laura Kawasaki, miembro del grupo de investigación.

Inmunodetección de ScHog1p activo en cepas expresando KISsk1 y KISsk1DA

De acuerdo con los fenotipos observados de las mutantes en las que se expresó KISsk1 y KISsk1DA, las dos formas de la proteína pueden rescatar el fenotipo de sensibilidad a medios hiperosmóticos. Además, $\Delta ssk1\Delta ste11$ [pYX142-KISsk1DA] crece como la cepa silvestre en medio rico, sugiriendo que su expresión no tiene un efecto deletéreo en las células relacionado a su capacidad de activar ScSsk2/22p. Para determinar el estado de activación de la vía de HOG provocado por la expresión heteróloga de KISsk1 o KISsk1DA, se realizó un ensayo de inmunodetección de ScHog1p, la última MAP cinasa de la cascada de señalización. Según lo esperado, en la cepa silvestre y $\Delta ssk1$ que contienen el plásmido vacío, se detecta ScHog1p fosforilado (su forma activa) sólo en los cultivos expuestos a choque hiperosmótico, como se muestra en la Figura 19, 1era y segunda película. Esta fosforilación se pierde en $\Delta ssk1\Delta ste11$ y en la cuádruple mutante, lo que correlaciona con la alta sensibilidad de las mutantes a sal (tercera y cuarta película). Se usó como agente estresante NaCl, que por ensayos anteriores en el laboratorio se sabe que ejerce el mismo efecto que KCl, con la menor concentración necesaria para activar a ScHog1p. En la doble mutante $\Delta ssk1\Delta ste11$ transformada con [pYX142-KISsk1] o [pYX142-KISsk1DA] se observa ScHog1p activo (carriles 4 y 6), mas no en la cepa con el plásmido vacío demostrando que la activación se debe a la expresión de los genes *KISsk1* y *KISsk1DA*. Ninguna de las dos proteínas de *K. lactis* parece activar constitutivamente la vía, pues no se detecta ScHog1p fosforilada en condiciones sin sal. En todos los casos, la fosforilación de ScHog1p depende de la presencia de ScSsk2/22p pues la banda correspondiente a ScHog1p activa se pierde en la cuádruple mutante transformada con los mismos plásmidos (última membrana en la figura).

Figura 19 Inmunodetección de fosfo-Hog1p ante shock hiperosmótico

Las cepas:

silvestre (By),

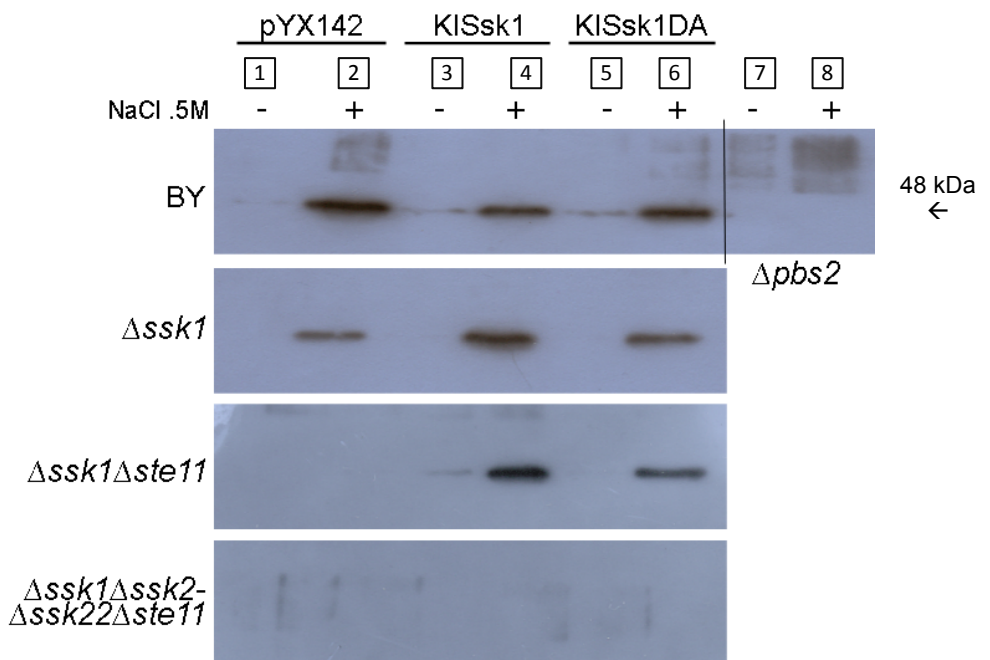
$\Delta ssk1$,

$\Delta ssk1\Delta ste11$ y

$\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$

fueron transformadas con las construcciones [pYX142], [pYX142-KISsk1] y [pYX142-KISsk1DA].

Se crecieron 12 horas en medio selectivo y después en medio rico para ser estimuladas 5 minutos con NaCl 0.5 M. Se detectó la forma fosforilada de ScHog1p con un anticuerpo anti-p38. Se utilizaron extractos de la cepa Δpbs (extremo derecho de 1era columna) como control negativo.



Efecto de expresión KISsk1 en medios con tunicamicina

Como se mencionó anteriormente, ciertos elementos de la vía de HOG en *S. cerevisiae* parecen participar en la respuesta que se genera ante la acumulación de proteínas desdobladas, pues se observa sensibilidad de las mutantes nulas a agentes como tunicamicina o β -mercaptoetanol ²⁰. Sin embargo, no son todos los componentes de la vía los que parecen tener un papel en esta respuesta, ni parecen funcionar mediante la vía UPR hasta ahora descrita. Tampoco se ha reportado el fenotipo ante estas drogas con mutaciones conjuntas en componentes de la vía de HOG. Por ello, se evaluó la forma en que las mutantes generadas en este trabajo crecen en tunicamicina y si la proteína de *K. lactis* es capaz de complementar también los defectos de crecimiento en presencia de la droga.

Aquellas cepas transformadas con KISsk1 crecen ligeramente mejor que los controles sin transformar o transformados con el plásmido vacío (Figura 20A, líneas 4 y 6 y Figura 20B, líneas 2 y 4), lo que indica una posible actividad de KISsk1 para establecer la resistencia a este tipo estrés.

Aunque el crecimiento de todas las cepas en tunicamicina es escaso, el ligero aumento en la densidad de las gotas observado en $\Delta ssk1\Delta ste11$ [pSAL-KISsk1] se pierde en las mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ [pSAL-KISsk1] como se muestra en la última línea de goteos de la Figura 16B, por lo que ScSsk2/22 también pudieran estar implicadas en la señalización a través KISsk1 ante los defectos en la glicosilación de proteínas producida con tunicamicina. En ningún cultivo se encontraron fenotipos significativos en medios adicionados con 2-desoxiglucosa, otro agente comúnmente usado para generar estrés de retículo endoplásmico y encender la vía UPR.

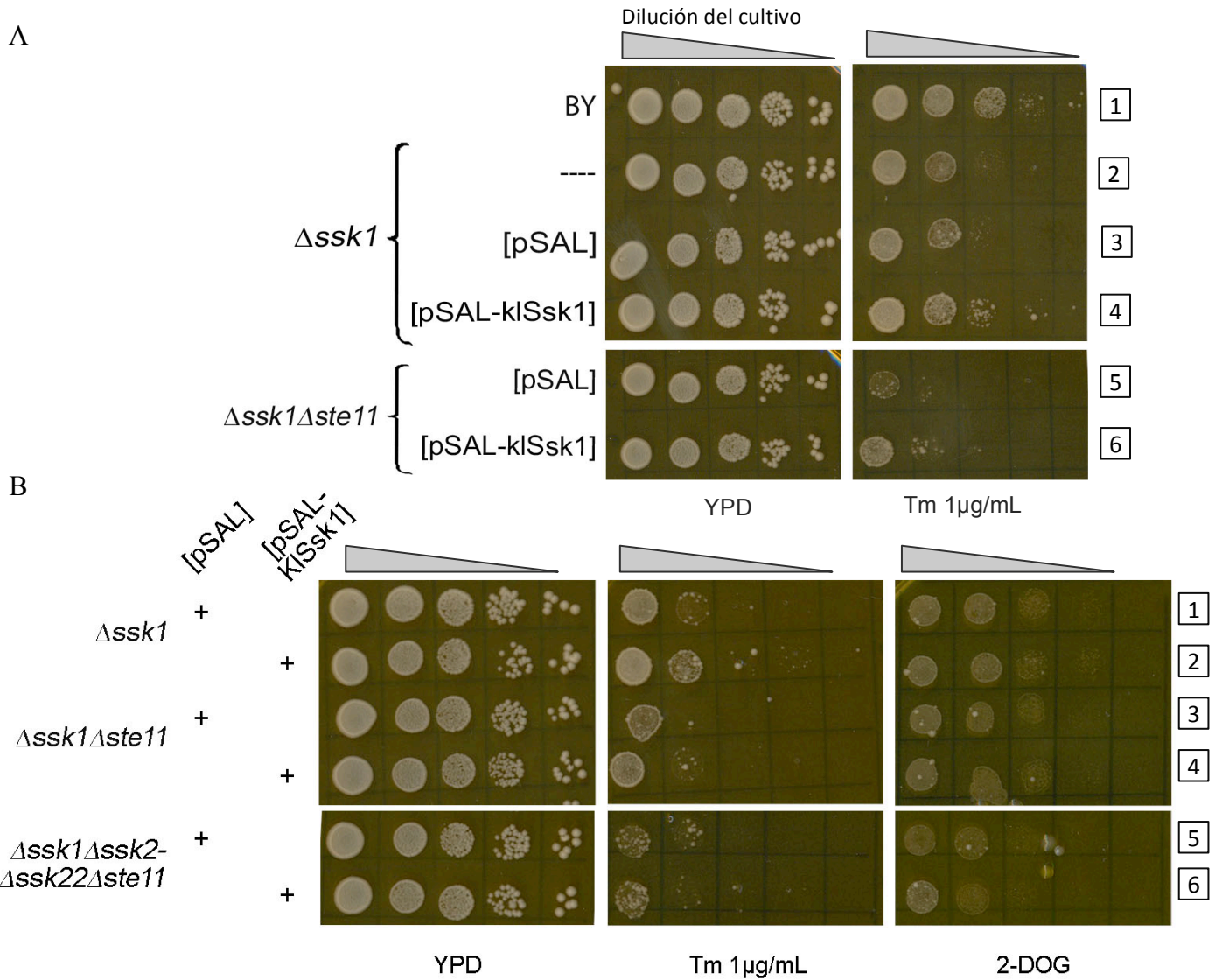


Figura 20 Sensibilidad a tunicamicina en mutantes expresando KISsk1.

Pruebas de crecimiento en gota de la cepa silvestre (BY) y las mutantes que se muestran a la izquierda transformadas ya sea con el plásmido vacío pSAL, o con pSAL-KISsk1. Cajas de medio rico YPD y YPD con tunicamicina o 2-desoxiglucosa (2-DOG).

Crecimiento en tunicamicina cepa $\Delta ssk2\Delta ssk22$

Otro gen de la rama SLN1 cuya mutación genera sensibilidad a tunicamicina es *SSK2*. Por ello, se utilizó en un principio la disminución de crecimiento en tunicamicina como método de discriminación de las dobles mutantes $\Delta ssk2\Delta ssk22$ (Figura 21, mutante 60C). Se encontró que la mutante sencilla $\Delta ssk22$ es resistente a tunicamicina 1 $\mu\text{g/mL}$, de manera similar a la cepa silvestre, mientras que la mutante sencilla $\Delta ssk2$ sí presenta defectos de crecimiento, como se observa en la Figura 22. La cepa $\Delta ssk2\Delta ssk22$ presenta sensibilidad similar a la cepa $\Delta ssk1$ y a la triple mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$.

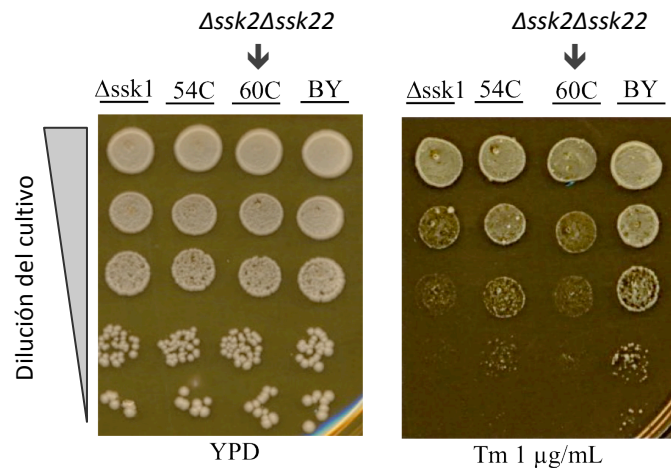


Figura 22 Fenotipo de sensibilidad a tunicamicina de $\Delta ssk2\Delta ssk22$
Pruebas de crecimiento por goteo de cepa silvestre (BY), la mutante sencilla $\Delta ssk1$ y dos clones (54C y 60C) segregantes de la cuza $\Delta ssk2 \times \Delta ssk22$. Siembra de diluciones seriales de los cultivos en medio rico YPD y medio con tunicamicina (Tm) por 48 hrs.

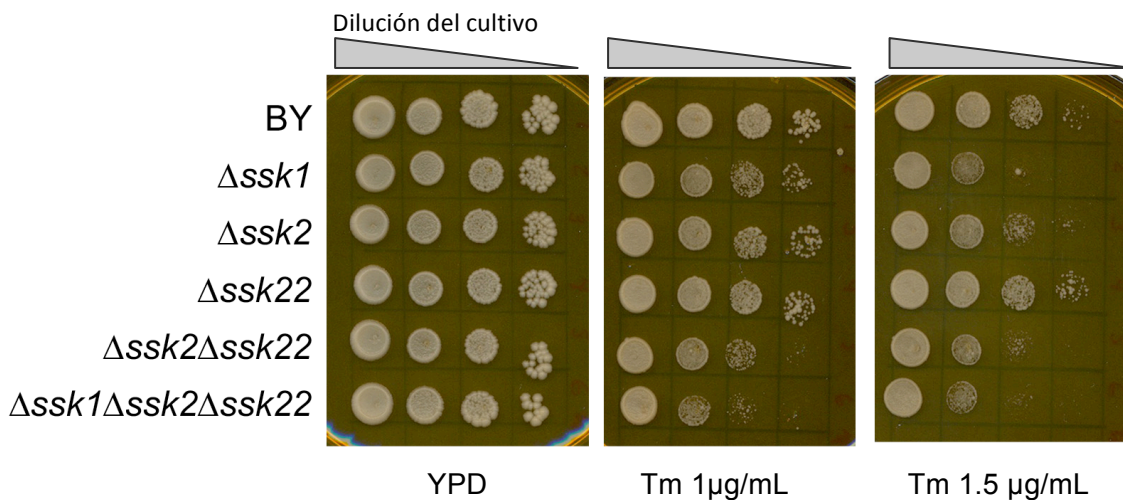


Figura 21 Sensibilidad a tunicamicina. Rama SLN1
Pruebas de crecimiento por goteo de la cepa Silvestre (BY) y distintas mutantes nulas de la rama SLN de *S. cerevisiae* sobre medio rico YPD y YPD con 1 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina.

Crecimiento de mutantes con alelo *ste11::nat* en tunicamicina

A lo largo de los experimentos realizados, se detectó una fuerte sensibilidad a tunicamicina en todas las mutantes de *STE11* (Figura 23). Este fenotipo no se ha reportado anteriormente y se asume que sólo la rama de SLN1 participa en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico. El fenotipo característico de esterilidad en la mutante sencilla $\Delta ste11$ fue corroborado en pruebas de apareamiento, así como el genotipo *ste11::KanMX* por PCR (Figura 8, cuarto carril). Las dos clonas de la cuádruple mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$, en las que el gen *STE11* fue interrumpido con el casete Nat, son aún más sensibles que la mutante sencilla (se muestra una de ellas en la Figura 23). En estas pruebas, se comparó el crecimiento de las mutantes *ste11* con las cepas Δhac y Δire . Hac1p e Ire1p se requieren para activar la vía de respuesta a proteínas desdobladas y como se puede observar, las mutantes cuádruples tienen defectos similares de crecimiento.

El efecto de la tunicamicina es el mismo en las otras cepas con mutaciones nulas de *ste11* junto con componentes de la vía SLN (Figura 20, $\Delta ssk1\Delta ste11$).

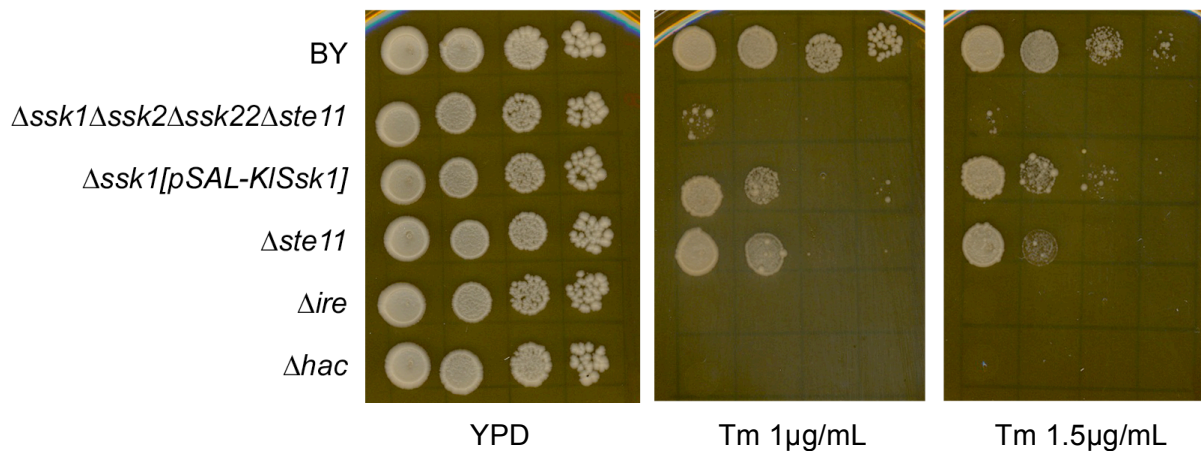


Figura 23 Fenotipo de sensibilidad a tunicamicina en cepas $\Delta ste11$

Prueba de crecimiento por goteo de la cepa silvestre (BY), la mutante $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$, la mutante $\Delta ssk1$ transformada con el plásmido pSAL que contiene la proteína de *K.lactis* KISsk1 y dos mutantes de la vía de respuesta a estrés de retículo endoplásmico, Δire y Δhac . Siembra en medio rico YPD y dos concentraciones de tunicamicina.

Discusión

La vía de respuesta a estrés osmótico ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae* y se usa como modelo para entender diversos aspectos de la transducción de señales, como la regulación de MAP cinasas, interacciones cruzadas con otras vías y respuestas transcripcionales globales, entre otros. No obstante, se sabe poco acerca de cuáles mecanismos en este sistema son generales y cuáles especie-específicos.

La señalización de la vía de HOG de *S. cerevisiae* cuenta con dos ramas en principio redundantes. Con respecto a la rama SHO, las mutantes $\Delta sho1$, $\Delta cdc42$, $\Delta ste20$, $\Delta ste50$ y $\Delta ste11$ no tienen defectos significativos de crecimiento en medios hiperosmóticos. De hecho, en otros hongos como *C. albicans* Sho1p parece tener funciones independientes a la regulación de Hog1p²⁸. Como Cdc42p, Ste20p y Ste11p también participan en la respuesta a feromonas y crecimiento filamentoso, las mutantes en estos genes suelen ser estériles e incapaces de crecer invasivamente. No obstante, su participación en la vía de HOG se detecta cuando se inactiva a la vez la vía SLN. Cepas que carecen de *SSK1*, *SSK2/22* o mutantes condicionales *sln1* conjuntamente con elementos de la rama de SHO1 son incapaces de responder al estrés hiperosmótico y no se observa en ellas fosforilación de Hog1p²⁶.

Lo mismo sucede con la rama SLN, en la que sólo se observan defectos significativos de crecimiento en medios de alta osmolaridad cuando se inactiva la vía de SHO1. $\Delta ssk1$, $\Delta ssk2\Delta ssk22$ y $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22$ no tienen un fenotipo notorio en medios con sal y es sólo cuando se elimina *STE11* que se observan osmosensibles. Las cinasas Ssk2p y Ssk22p tienen una función redundante en esta vía ya que las dobles mutantes $\Delta ssk2\Delta ste11$ o $\Delta ssk22\Delta ste11$ resisten tan bien como la cepa silvestre a medios hiperosmóticos y es sólo al eliminar los tres genes *SSK2*, *SSK22* y *STE11* que se provoca osmosensibilidad. Mutantes claramente sensibles a agentes como KCl, NaCl o sorbitol son $\Delta pbs2$ (como se observa en la Figura 14B) y $\Delta hog1$, los elementos en los que confluyen ambas vías.

La expresión de Ssk1p de *K. lactis* es capaz de complementar el defecto de osmosensibilidad en las dos clonas de *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$ probadas (Figura 14-Figura 16). Las transformantes que contienen esa construcción pueden crecer de nuevo en KCl hasta la máxima concentración probada, de 1M. El rescate del fenotipo de cepas expresando K1Ssk1 está mediado por las proteínas ScSsk2p y/o ScSsk22p ya que mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$ transformadas con el mismo plásmido siguen siendo muy sensibles a sal. Este resultado indica también que el regulador de respuesta de *K. lactis* es capaz de activar, probablemente mediante el mismo fenómeno de unión Ssk1-Ssk2, a las cinasas de *S. cerevisiae* ScSsk2 y/o ScSsk22p.

Se expresaron tanto la versión silvestre de K1Ssk1p (K1Ssk1) como la mutante K1Ssk1DA en otro vector de expresión. K1Ssk1DA tiene una sustitución del ácido aspártico en la posición 444 del dominio receptor y experimentos en el grupo de investigación han demostrado que esta proteína no es fosforilable por K1Ypd1p en sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*.

La expresión de K1Ssk1 en dos clonas $\Delta ssk1\Delta ste11$ complementa el fenotipo en sal de ScSsk1p, pues estas cepas crecen de la misma manera que $\Delta ssk1$ en medios con y sin KCl (Figura 16).

Sorprendentemente, la mutante K1Ssk1DA también suprime el fenotipo de sensibilidad en las mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$. Dichas transformantes presentan el mismo fenotipo que aquellas en las que se expresa K1Ssk1, tanto en medio rico como en medios de alta osmolaridad (Figura 16 y Figura 17). Se buscó también si existen diferencias en cuanto a al nivel de activación de ScHog1p en los dos tipos de transformantes evaluando el nivel de fosforilación de la cinasa en condiciones normales e hiperosmóticas. En condiciones normales, no se detecta ScHog1p fosforilado ya sea bajo la expresión de K1Ssk1 o K1Ssk1DA. Al exponer los cultivos a un ligero choque hiperosmótico (de 0.4 M NaCl por 5 minutos) se detectan niveles de ScHog1p fosforilado con una magnitud similar a la cepa silvestre (Figura 19).

Lo anterior indica que el regulador de respuesta Ssk1p de *K. lactis* es capaz de acoplarse al sistema de respuesta a estrés hiperosmótico de *S. cerevisiae*, transmitiendo la señal del sistema de fosforelevo hacia la MAP cinasa ScHog1p a través de ScSsk2/22p para adaptarse ante estímulos de alta osmolaridad extracelular. Estos resultados son incompatibles con la hipótesis de que en *K. lactis* el sistema de fosfotransferencia pudiera regular la vía de manera positiva. De ser este el caso, la forma no fosforilada de regulador de respuesta sería incapaz de activar a K1Ssk2p (o ScSsk2/22p en el sistema heterólogo), entendiéndose por activación la capacidad de interactuar con las MAPKKKs, liberando su actividad de auto-fosforilación. Además, la transferencia continua de fosfatos desde el sistema de fosforelevo activo en condiciones normales para *S. cerevisiae*, generaría una forma fosforilada (y bajo la misma suposición, activa) de K1Ssk1, encendiendo la vía en ausencia de un estímulo hiperosmótico. Los fenotipos de crecimiento en medio con y sin sal así como la inmunodetección de ScHog1p indican lo contrario.

Es por ello que podemos definir a K1Ssk1 como un homólogo funcional de ScSsk1p. Sin embargo, se detectan diferencias fundamentales en los sistemas de respuesta entre ambas especies. Por un lado, impedir la transferencia de fosfatos hacia K1Ssk1 por medio de la sustitución del Asp444Ala, no es suficiente para producir una proteína constitutivamente activa. Este fenómeno quizá sea dependiente de la cantidad de moléculas de K1Ssk1DA presentes y, dado que en el sistema experimental utilizado no se moduló su expresión a nivel transcripcional.

Dado que K1Ssk1 parece funcionar de manera similar al homólogo de *S. cerevisiae*, se esperaría que K1Ssk1DA tuviese actividad constitutiva, como se ha descrito en la mutante equivalente ScSsk1Asp554Ala (ScSsk1DA)²⁶. Saito y colaboradores describieron la mutante del residuo 554, en la que se sustituyó el ácido aspártico por asparagina. En esta proteína no se detecta transferencia de fosfatos radioactivos desde Ypd1p, a diferencia de la versión silvestre. Además, su inducción en mutantes $\Delta sln1\Delta ssk1$ o $\Delta ssk1$ provoca pérdida de viabilidad así como una rápida fosforilación de Hog1p^{9, 25, 26, 27}. Cabe mencionar que en el estudio detallado de sustitución del ácido aspártico por otros diez residuos distintos, se detectaron variaciones tanto en la

pérdida de viabilidad celular, como en la expresión de reporteros de la vía de HOG ²⁶. Para evaluar el efecto de expresión de la proteína endógena de *S. cerevisiae* y la mutante ScSsk1DA en los fondos genéticos utilizados en este trabajo, se indujo a ScSsk1 y ScSsk1DA en $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk1\Delta ste11$

(Figura 18). Al expresarse la forma silvestre ScSsk1, se observa el efecto de complementación en $\Delta ssk1\Delta ste11$.

Cuando se indujo ScSsk1DA en las mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$ y $\Delta ssk1$ se detectaron células viables, aunque su crecimiento es menor comparado con la cepa silvestre o aquellas expresando ScSsk1. Esto indica que la presencia de ScSsk1DA es deletérea para las células. No obstante, la magnitud del efecto tóxico parece variar según el contexto particular en el que se exprese. A diferencia de la forma no fosforilable de *K. lactis*, ScSsk1DA no parece complementar el fenotipo de sensibilidad a sal de la cepa $\Delta ssk1\Delta ste11$, quizá debido a que la actividad de ScSsk1DA provoque una activación constitutiva en la vía de HOG tóxica para las cepas, inclusive antes de ser expuestas a medios con alta osmolaridad.

El hecho de que KISsk1 sea capaz de complementar la ausencia de ScSsk1 sugiere que el sistema de fosforelevo en *K. lactis* está encendido bajo condiciones normales. Sin embargo, el sistema debe operar de manera distinta, dado que mutantes nulas en los componentes *sln1* o *ypd1* son viables y moderadamente sensibles a sal o sorbitol. Los fenotipos de osmosensibilidad de las mutantes en elementos cascada abajo *pbs2* y *hog1* son similares entre ambas especies, así como la identidad de sus secuencias (Figura 24). Ssk1p y Ssk2p comparten menor identidad. En la Figura 25 se muestra un alineamiento de las secuencias de *K. lactis* y *S. cerevisiae*, las cuales comparten 30% de identidad y 40% de similitud. Las regiones conservadas corresponden al dominio regulador de respuesta, especialmente la región cercana al residuo receptor de fosfatos. A pesar de esto, Ssk1p tiene uno de los valores más bajos de homología promedio, dentro de un grupo de cuarenta genes involucrados en la vía, comparando la secuencia de *S. cerevisiae* con los ortólogos identificados en otros 19 hongos ²². Por ello, es probable que el funcionamiento de ambas vías difiera en este punto o en proteínas que actúen sobre Ssk1p. La mayoría de las levaduras cuentan con más cinasas de histidina que reguladores de respuesta ⁴³, por lo que es posible que existan más elementos regulando a KISsk1p que los hasta ahora identificados. La expresión de ScSsk1 en su forma silvestre y la mutante equivalente ScSsk1DA en *K. lactis* podría clarificar si la diferencia de actividad en las vías la confiere únicamente Ssk1p.

Sln1	Ypd1	Ssk1	Ssk2	Pbs2	Hog
56%	52%	29%	47%	61%	82%

Figura 24 Identidad general de secuencias proteicas entre los ortólogos identificados en *K. lactis* en comparación con las secuencias de *S. cerevisiae* ⁴².

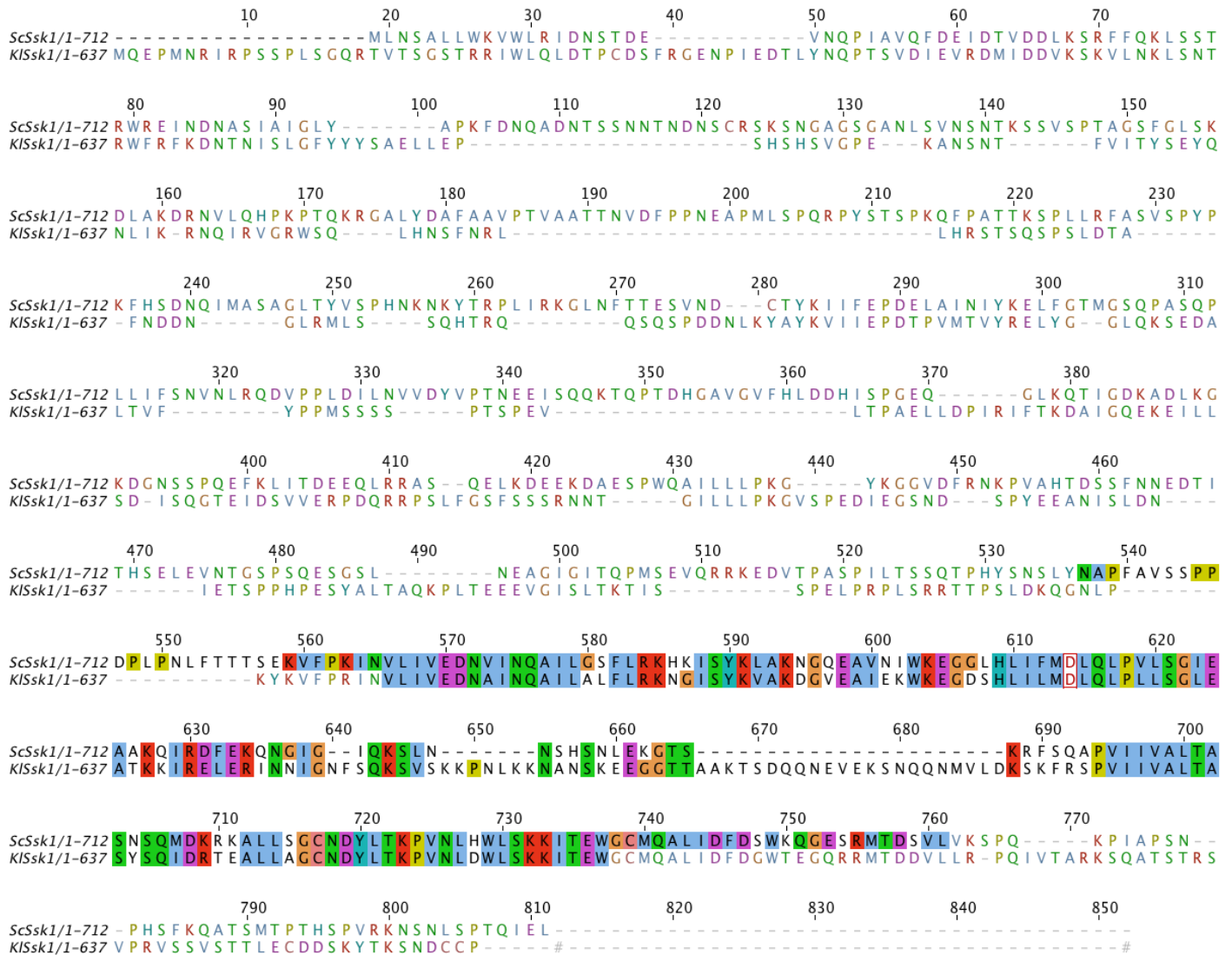


Figura 25 Alineamiento de secuencias proteicas de Ssk1p de *S. cerevisiae* (arriba) versus *K. lactis* (abajo). Se muestran aminoácidos similares en el mismo color (criterio ClustalX) y los dominios reguladores de respuesta reconocidos por análisis *in silico* con cajas de colores. El ácido aspártico receptor se indica en letras y caja roja en la posición 614. Alineamiento global tipo Needleman-Wunsch resultado del programa Needle-Emboss y editado en Jalview. Secuencias utilizadas *S. cerevisiae*: Uniprot Q07084, *K. lactis*: Genolevures KLLA0E09505p.

Por otra parte, se encontraron en las mutantes fenotipos relacionados con defectos en la glicosilación de proteínas. La tunicamicina se emplea para generar estrés de retículo endoplásmico pues provoca la acumulación de proteínas con defectos de N-glicosilación dentro del retículo^{22, 44, 45, 46}. Estudiando el fenómeno en *S. cerevisiae*, se encontraron en estas condiciones cambios en la expresión de alrededor de 100 genes que no están directamente involucrados con la vía de respuesta a proteínas desdobladas (UPR) o con la degradación de proteínas asociadas a retículo endoplásmico (ERAD), el otro proceso asociado a este tipo de estrés⁴⁵. Entre esos genes se encuentran algunos involucrados en la vía de respuesta a estrés de pared celular y estrés hiperosmótico; las mutantes Δpbs y Δhog son sensibles a tunicamicina, pero hasta ahora no se sabe si en dichas mutantes hay defectos en la vía UPR. El estudio de estas mutantes revela que no hay cambios en los eventos necesarios para que se transmita la señal de la vía UPR al núcleo o en la respuesta transcripcional típicamente generada en esta vía²⁰. En ese estudio, se observó también que es necesaria la actividad de cinasa tanto de Pbs2p como de Hogp para que las células sobrevivan en medios con tunicamicina. Hasta ahora, no se ha reportado sensibilidad de cepas con defectos en la vía de SHO1.

Buscando más componentes de la vía de HOG que pudiesen estar involucrados en generar resistencia a tunicamicina así como fenotipos relevantes de los fondos genéticos utilizados, se encontró que *S. cerevisiae* $\Delta ssk1$ y la doble mutante $\Delta ssk2\Delta ssk22$ no crecen como una cepa silvestre. El efecto parece ser sobre el mismo mecanismo, pues al eliminar los tres genes *SSK1*, *SSK2* y *SSK22* en la triple mutante, no se observa un efecto aditivo en la sensibilidad a tunicamicina.

Cuando se inactiva ScSte11p, es necesario interrumpir los dos genes *SSK2* y *SSK22* para prevenir la fosforilación de Pbs2p, por lo que ScSsk2p y ScSsk22p se consideran proteínas redundantes. ScSsk2p es alrededor de 250 residuos más grande que ScSsk22p, comparten una identidad global del 44% y tienen dominios de cinasa tipo Serina/treonina altamente conservados. La región descrita en ScSsk2p que se une a ScSsk1p (Ssk1BD) no comparte tanta similitud con ScSsk22p; sin embargo, se asume que ScSsk22p es activada del mismo modo; por la unión de ScSsk1p en un proceso de autofosforilación intramolecular y formando posiblemente homodímeros²⁶. En este trabajo, se detectó una diferencia de función entre estas dos cinasas, estando ScSsk2p implicada en conferir resistencia a la toxicidad de tunicamicina, mientras que ScSsk22p no. Esto favorece la noción de que el mecanismo por el que esta levadura utiliza componentes que participan en la vía de HOG es distinto al que utiliza para responder a estrés generado por defectos en la N-glicosilación de proteínas. Los fenotipos mencionados no se observan en medios con el otro agente usado como estresor de retículo endoplásmico (2-desoxiglucosa), por lo que es necesario determinar si la diferencia de actividad observada en estas proteínas no se debe a alteraciones de glicosilación en su propia estructura (el análisis *in silico* de las dos secuencias con el software Prosite, predice alrededor de 10 y 20 sitios potenciales de N-glicosilación en ScSsk2p y ScSsk22p, respectivamente).

En *K. lactis*, las proteínas de la rama SLN1 también son sensibles a tunicamicina, en rangos de concentración menores a la cepa utilizada de *S. cerevisiae*. Las mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$ transformadas con [pSAL-KISsk1] crecen ligeramente mejor en tunicamicina que las cepas control, por lo que KISsk1 puede ser también un homólogo funcional en la respuesta que se genera en *S. cerevisiae* ante inhibidores de la N-glicosilación.

Conclusiones

En este trabajo se investigó el papel del regulador de respuesta Ssk1p de *K. lactis*, dentro del sistema de respuesta a estrés hiperosmótico de *S. cerevisiae*.

La proteína KISsk1p es capaz de complementar los defectos de osmosensibilidad que muestran las mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta ssk1\Delta ste11$. El fenómeno de complementación se pierde al expresar dicha proteína en mutantes $\Delta ssk1\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$. Esto indica que la actividad de KISsk1p es similar a la del homólogo ScSsk1p y que puede activar a las MAPKKKs ScSsk2p y ScSsk22p ante estímulos de alta osmolaridad extracelular para encender la vía de HOG en esta levadura.

La mutante KISsk1DA no recibe grupos fosfato en el dominio regulador de respuesta. Al expresar KISsk1DA en *S. cerevisiae*, no disminuye la viabilidad celular y al igual que con KISsk1p, se restaura el fenotipo osmoresistente en las mutantes $\Delta ssk1\Delta ste11$, transmitiendo la señal mediante ScSsk2/22p. De esta manera, comprobamos que la versión no fosforilable de KISsk1p es activa en condiciones de hiperósmosis, y su expresión en el fondo genético mencionado no produce un fenotipo letal.

El estado de fosforilación de ScHog1p concuerda con los fenotipos observados tanto para KISsk1p como KISsk1DA.

Con estos resultados concluimos que, pese a la diferencia de fenotipos en otras mutantes del sistema de fosforelevo, Ssk1 de *K. lactis* es un homólogo funcional en la vía de respuesta a estrés hiperosmótico de *S. cerevisiae*.

Respecto a las mutantes analizadas en *S. cerevisiae*, existe una diferencia funcional entre las cinasas ScSsk2p y ScSsk22p en cuanto a la respuesta necesaria para resistir a agentes inhibidores de la N-glicosilación.

Bibliografía

- 1 Micheline Wésolowski-Louvel Hiroshi Fukuhara, K.D.B. *Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology of Non-Conventional Yeasts*. (Springer Verlag: 1996).
- 2 Dujon, B. et al. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44 (2004).
- 3 Rosa Peter Gabor (Eds.), C.A.S. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. 580 p (2006).
- 4 Dujon, B. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends in genetics: TIG* **22**, 375-87 (2006).
- 5 Kawasaki, L., Ongay-Larios, L. & Coria, R. Cascadas de MAP cinasas en apareamiento y estrés en levadauras. *Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII* 103-116 (2009).at <http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq09v33p103-116_RobertoCoria2009.pdf>.
- 6 Chen, R.E. & Thorner, J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311-1340 (2007).
- 7 Schwartz, M. a & Madhani, H.D. Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* **38**, 725-48 (2004).
- 8 Hohmann, S., Krantz, M. & Nordlander, B. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**, 29-45 (2007).
- 9 Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-5 (1994).
- 10 Hohmann, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372 (2002).

-
- 11 Proft, M., Gibbons, F.D., Copeland, M., Roth, F.P. & Struhl, K. Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **4**, 1343-52 (2005).
 - 12 Maeda, T., Takekawa, M. & Saito, H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**, 554-558 (1995).
 - 13 Patterson, J.C., Klimenko, E.S. & Thorner, J. Single-cell analysis reveals that insulation maintains signaling specificity between two yeast MAPK pathways with common components. *Science signaling* **3**, ra75 (2010).
 - 14 Rourke, S.M.O. & Herskowitz, I. Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis □. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 532-542 (2004).
 - 15 Robinson, V.L., Buckler, D.R. & Stock, a M. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nature structural biology* **7**, 626-33 (2000).
 - 16 Wu, X. et al. The evolutionary rate variation among genes of HOG-signaling pathway in yeast genomes. *Biol Direct* **5**, 46.
 - 17 Bourret, R.B., Borkovich, K.A. & Simon, M.I. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry* **60**, 401-41 (1991).
 - 18 Thomason, P. & Kay, R. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. **113 (Pt 1)**, 3141-3150 (2000).
 - 19 García-Rodríguez, L.J., Durán, a & Roncero, C. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *Journal of bacteriology* **182**, 2428-37 (2000).
 - 20 Torres-Quiroz, F., Garcia-Marques, S., Coria, R., Randez-Gil, F. & Prieto, J.A. The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J Biol Chem* **285**, 20088-20096 (2010).

-
- 21 Chen, Y. et al. Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cancer research* : *MCR* **3**, 669-77 (2005).
- 22 Varki, A. et al. *Essentials of Glycobiology, Second Edition*. 784 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2008).at <<http://www.amazon.com/Essentials-Glycobiology-Second-Ajit-Varki/dp/0879697709>>.
- 23 Kim, I., Xu, W. & Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 1013-30 (2008).
- 24 Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 519-29 (2007).
- 25 Posas, F. et al. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **86**, 865-75 (1996).
- 26 Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R. & Saito, H. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* **28**, 5172-5183 (2008).
- 27 Posas, F. & Saito, H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**, 1385-1394 (1998).
- 28 Bahn, Y.-S. et al. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 57-69 (2007).
- 29 Nagahashi, S. et al. Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **144** (Pt 2), 425-32 (1998).
- 30 Ochiai, N. et al. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest management science* **57**, 437-42 (2001).

-
- 31 Furukawa, K. et al. Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Applied and environmental microbiology* **68**, 5304-10 (2002).
- 32 Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y. & Tanaka, C. Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryotic cell* **4**, 1820-8 (2005).
- 33 Sambrook J Maniatis T, F. ef *Molecular cloning - a laboratory manual*. (cold spring harbor laboratory press: New York, 1989).
- 34 Hoffman, C.S. & Winston, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272 (1987).
- 35 Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
- 36 Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* **153**, 163-8 (1983).
- 37 Chalres, B. SGA Methodology. The Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular at <http://www.utoronto.ca/boonelab/sga_technology/index.shtml>
- 38 David C. Amberg Jeffrey N. Strathern, D.J.B. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. 230 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2005).
- 39 Sung, M.-kyung & Huh, W.-ki Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein – protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 767-775 (2007).
- 40 Winzeler, E.A. et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 901-6 (1999).
- 41 Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, a a & Gaxiola, R. Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **172**, 169-70 (1996).
- 42 Krantz, M., Becit, E. & Hohmann, S. Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. **49**, 137-151 (2006).

-
- 43 Catlett, N.L., Yoder, O.C. & Turgeon, B.G. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryotic cell* **2**, 1151-61 (2003).
- 44 Patil, C. & Walter, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current opinion in cell biology* **13**, 349-55 (2001).
- 45 Travers, K.J. et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-58 (2000).
- 46 Kim, I., Xu, W. & Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 1013-30 (2008).