



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“PAPEL DE LAS PROTEÍNAS REDUNDANTES SSK2P Y SSK22P EN LA RESPUESTA A INDUCTORES DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LEVADURA”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**URIEL CRUZ MARTÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Dr. Roberto Coria Ortega**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**Dra. María Soledad Funes Argüello**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Dr. Luis Servín González**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

*MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega en el laboratorio 302-orientado, del departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el apoyo técnico y los comentarios durante el proyecto del Dr. José Francisco Torres Quiroz.

Al comité tutorial, integrado por el Dr. Luis Servín González, la Dra. Soledad Funes Argüello y el Dr. Roberto Coria Ortega.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y el apoyo de la señora Maricela Bolaños Martínez.

Así como la asesoría técnica del personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, la Dra. Laura Ongay Larios, la Biól. María Guadalupe Codiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera.

Se agradece el apoyo del M. en C. Gerardo Coello Coutiño de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

El proyecto fue apoyado por CONACyT, proyecto número 166734 y PAPIIT (DGAPA, UNAM) proyecto número IN206513.

Se agradece el apoyo de PAEP, UNAM.

Este trabajo fue apoyado por una beca de maestría de CONACyT.

El jurado de este trabajo estuvo integrado por:

Presidente	Dr. Antonio Peña Díaz
Vocal	Dra. Martha Robles Flores
Vocal	Dr. Roberto Hernández Fernández
Vocal	Dr. Dimitris Georgellis
Secretario	Dra. Alicia González Manjarrez

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis Padres y mi hermana, que siempre me apoyaron. Sin ellos, tener en las manos ésta tesis sería prácticamente imposible. Además de aguantarme en todo sentido, no es fácil, GRACIAS.

A mi familia extendida, mi abue, mis tíos y Omar, que de una u otra forma me echaron la mano.

A Lorena, por estar conmigo, apoyarme, darme tu amor y comprensión. Ha habido momentos difíciles pero son los que más importan, nunca me dejaste sólo por fea que se puso la situación, al contrario, supiste entenderme, darme tiempo y unos cuantos zapes para seguir en el camino y no desistir.

Al Dr. Roberto Coria por dejarme trabajar en su laboratorio, su apoyo y comprensión desde mi rotación de la licenciatura hasta ahora, todos sus comentarios siempre me han ayudado a mejorar en el lab y en la vida.

A TODOS en el laboratorio 302-Ote., especialmente Abraham, Mariana y Eunice, que me hicieron reír mucho, relajarme y trabajar algunas veces.

A Laurita Kawasaki, por tenerme paciencia, aguantar mis ocurrencias, consentirnos y mantenernos a raya en el lab, sin ti todo sería anarquía y perdición. Sobre la misma línea, a Mary, que hace lo que muy poca gente hace en su posición, nos tiene chiqueados pero se agradece infinitamente.

A mis amigos: Paco, Luis, Manuel, Akram, por ser mis compañeros en la ciencia y en la vida, a distancia y presenciales.

A la UNAM, por la oportunidad que muchos desean pero no tantos tenemos, es un orgullo ser Puma.

Al Dr. Christian R. Landry que me dejó trabajar en su laboratorio, además de los integrantes de su laboratorio, sobre todo Luca Freschi y Guillaume Charron.

Finalmente a todas las personas que me acompañaron en este largo camino de la maestría, los momentos de tribulación y los de diversión.

## ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
Genes Parálogos.....	5
Vía de respuesta a estrés osmótico .....	7
Respuesta a proteínas mal plegadas.....	11
Ssk2 y Ssk22.....	15
ANTECEDENTES .....	17
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVOS.....	19
METODOLOGÍA.....	20
Cepas .....	20
Plásmidos y construcciones .....	20
Transformación de las levaduras.....	21
Transformación de bacterias.....	22
Condiciones y medios de cultivo .....	22
Ensayos de diluciones seriadas .....	22
Ensayos de crecimiento.....	23
Ensayos de actividad de $\beta$ -galactosidasa.....	23
Ensayo de complementación con fragmentos de proteínas.....	24
RESULTADOS.....	27
Existe un fenotipo distinto entre las mutantes $\Delta$ ssk2 y $\Delta$ ssk22 .....	27
La respuesta a tunicamicina mediada por Hog1p y Ssk2p/Ssk22p no activa la UPR .....	28
Ssk2p y Ssk22p no son equivalentes en ensayos de complementación .....	30
Las interacciones de Ssk2p y Ssk22p con otras proteínas en diversas condiciones de estrés son distintas.....	32
Las mutantes nulas de los interactores de Ssk2p y Ssk22p son sensibles a inductores de estrés de retículo endoplásmico.....	39
DISCUSIÓN.....	43
La función de los genes parálogos SSK2 y SSK22 no es redundante en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducida por tunicamicina .....	43
La respuesta a tunicamicina inducida por Ssk2p y Ssk22p es independiente de la UPR.....	44
Las interacciones de Ssk2p y Ssk22p en respuesta a tunicamicina son distintas .....	45
Existen otras proteínas involucradas en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducida por tunicamicina .....	46
CONCLUSIONES .....	48
APÉNDICE.....	49

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato reductasa
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>ERAD</b>	Degradación asociada al retículo endoplásmico
<b>ERE</b>	Estrés de retículo endoplásmico
<b>Hpt</b>	Fosfotransferasa que contiene histidina
<b>HOG</b>	High Osmolarity Glycerol
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>MAP</b>	Proteínas activadas por mitógenos
<b>MAPKK</b>	MAP cinasa cinasa
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b><i>o</i>-NPG</b>	<i>orto</i> -nitrofenil-β-galactósido
<b>PCA</b>	Ensayo de complementación de fragmentos de proteínas
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SGD</b>	<i>Saccharomyces</i> genome database
<b>Tm</b>	Tunicamicina
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas
<b>UPRE</b>	Elemento de respuesta a proteínas mal plegadas

## RESUMEN

Los organismos poseen diversos mecanismos para incrementar su variabilidad genética, uno de estos es la duplicación génica; este proceso genera dos copias de un mismo gen, que son llamados “genes parálogos”. Los pares de genes parálogos pueden conservar su función, o la nueva copia puede adquirir funciones o especializaciones nuevas.

Los genes parálogos *SSK2* y *SSK22* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* codifican para dos proteínas (Ssk2p y Ssk22p, respectivamente) que participan en la vía de respuesta a estrés osmótico, denominada vía HOG (*High Osmolarity Glycerol*); el objetivo de la vía es la fosforilación de la MAP cinasa Hog1p, que a su vez activa a diversos genes que le permiten a la célula responder a condiciones hiperosmóticas. Ssk2p y Ssk22p son activadas por la vía del fosforrelevo, para posteriormente fosforilar a Pbs2p, la MAPKK que activa a Hog1p.

Además de ser parte de la vía HOG, diversos componentes de ésta vía participan en la respuesta a Estrés de Retículo Endoplásmico (ERE).

En el presente trabajo, mediante ensayos de diluciones seriadas, observamos diferencias fenotípicas de mutantes nulas  $\Delta ssk2$  y  $\Delta ssk22$  en presencia de tunicamicina, una droga inhibidora de la glicosilación de proteínas. Aunque comprobamos, mediante la expresión de un gen reportero, que éstas células inducen la vía clásica de respuesta a proteínas mal plegadas, son sensibles a la tunicamicina, lo que sugiere que existe otra vía para responder a éste estímulo.

Utilizando un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas observamos que las interacciones de Ssk2p y Ssk22p son distintas cuando las células se estimulan con tunicamicina. Posteriormente observamos que mutantes nulas de algunos genes que codifican para interactores de Ssk2p son sensibles a tunicamicina, lo que sugiere que participan en la respuesta a ERE y que pueden formar parte de una vía.

Nuestros resultados indican que Ssk2p tiene un papel más importante que Ssk22p en la respuesta a ERE inducido por tunicamicina, lo que sugiere que para éste sistema no son redundantes y han divergido en sus funciones.

## ABSTRACT

Living organisms have several mechanisms to increase genetic diversity; one of which is gene duplication, a process that generates two copies of a given gene, these copies are called “paralogous genes”. Paralogous genes pairs may conserve their function, or the arising copy can acquire new functions or specializations.

*Saccharomyces cerevisiae*'s paralogous genes, *SSK2* and *SSK22* code for two proteins (Ssk2p and Ssk22p, respectively) that participate in the HOG (*High Osmolarity* Response) response; whose goal is MAPK Hog1p phosphorylation, in order to activate several hyperosmotic conditions responsive genes. After being activated by a phosphorelay system, Ssk2p or Ssk22p phosphorylate the MAPKK Pbs2p, which now is able to activate Hog1p.

Besides activating the HOG pathway, many of its components also participate in the Endoplasmic Reticulum Stress (ERS) response.

In this work, using serial dilution spotting assays, we observed phenotypic differences in  $\Delta$ *ssk2* and  $\Delta$ *ssk22* null mutants in tunicamycin-containing media, a protein-glycosylation inhibitor. By the use of a reporter gene, we proved that these cells are able to mount the classic unfolded protein response, but are tunicamycin-sensitive though, these data suggests that there may be another response pathway to this stimulus.

By a protein-fragment complementation assay, we observed that Ssk2p and Ssk22p's interactions are different when cells are stimulated with tunicamycin.

Later, null mutants for Ssk2p interactors were grown in tunicamycin and proved to be sensitive to such condition, suggesting that those proteins participate in the ERS response and may be part of a pathway.

Our results point out that Ssk2p has a more prominent role than Ssk22p in the tunicamycin-induced ERS response, suggesting that in this system both proteins have diverged in their function and are no longer redundant.



## INTRODUCCIÓN

### *Genes Parálogos*

Una estrategia que permite una mayor adaptabilidad a la célula es la duplicación génica, ya que esto permite la aparición de material genético que sirve como materia prima para generar diversidad e incluso la aparición de nuevas funciones. Los eventos de duplicación, a cambio de la ganancia en material que genera diversidad, tienen un costo en la estabilidad del genoma, que se contrarresta con pérdidas de material genético, mutaciones y reorganización del genoma.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado diversos bloques que sugieren que existió un evento de duplicación de todo el genoma previo a la divergencia entre esta levadura y *Kluyveromyces lactis*. Aunque el genoma de *S. cerevisiae* no es mucho más grande ni tiene muchos más genes que levaduras cercanas que no sufrieron el evento de duplicación, existe evidencia de dicho evento debido a la sintenia de diversos genes parálogos, aunque se calcula que cerca del 88% de los genes duplicados originales se perdieron.

Los eventos de duplicación génica, locales o del genoma completo generan dos o varias copias de un gen en diferentes posiciones a lo largo del genoma. Este proceso es fundamental en la aparición de genes funcionalmente distintos. Se dice que la copia de un gen es perfecta si, después del evento de duplicación la delección de una u otra copia no genera ningún fenotipo medible. Probabilísticamente, este tipo de eventos es muy raro y, de llegar a suceder, su tasa de fijación es baja, debido a la presencia de la otra copia igualmente funcional. Los genes parálogos pueden identificarse debido a que suelen encontrarse en regiones adyacentes a otros genes parálogos con el mismo orden y orientación, aunque estas regiones no suelen ser muy extensas debido a reorganización de los cromosomas y a delecciones (Kellis et al., 2004).

Aunque el proceso por el cual se conservan o pierden estas copias de genes aún no se ha definido claramente, se han sugerido diversos modelos y mecanismos.

En el modelo denominado de mutación durante la no funcionalidad (MDN, Mutation During Non-functionality), estos genes parálogos aumentan la variabilidad de al menos una de las copias, debido a la disminución en la presión selectiva. La copia emergente puede acumular todo tipo de mutaciones (transiciones, transversiones, cambios del marco abierto de lectura, aparición de codones de paro, inversiones, deleciones, etc.) aleatorias, que serán neutrales y, en consecuencia, puede ser silenciada o volverse una secuencia de DNA no codificante que puede mantenerse por selección positiva Darwiniana o deriva génica. La selección positiva sólo se mantendrá siempre que el gen siga siendo expresado y los cambios en la secuencia de aminoácidos tengan un efecto sobre la función de la proteína que se vean reflejados en la adecuación del organismo. En el caso en que el gen pierda su expresión, difícilmente podrá recuperarla, debido a que la afectación de nuevas mutaciones será nula y provocará que se vuelva un pseudogen y, de volver a ser expresado, lo más probable será que simplemente sea una secuencia sin función alguna, fijada solamente por deriva. En este aspecto, el modelo no considera que las mutaciones en la copia del gen pueden provocar una disminución en la adecuación del individuo, debido a que la proteína codificada puede interactuar con otras proteínas y esa interacción puede ser anómala. Además, en organismos poliploides, un individuo homocigo para ese gen mutado tendrá una deficiencia adaptativa muy marcada. No obstante este fenómeno, en el que sólo una copia del gen tiene una tasa de mutación más alta, sucede en la mayoría de genes parálogos, al menos en *S. cerevisiae* (Gu et al., 2003; Li et al., 2010).

Un proceso más común sucede cuando el gen ancestral posee dos funciones; entonces un evento de duplicación puede llevar a la especialización de cada gen nuevo en sólo una función, respectivamente. Durante este proceso, ninguno de los genes pasa por un periodo de no funcionalidad; cada nuevo gen se especializa en una función específica de las que tenía el gen ancestral y, en el caso de organismos pluricelulares, mediante cambios en su expresión, ya sea general o tejido específica, o adquiriendo cambios que provoquen la pérdida de alguna de las funciones originales mediante selección natural que limita la frecuencia de sólo algunos aminoácidos en posiciones a lo largo del gen. Estos eventos

pueden atravesar una etapa donde se pierda la expresión o función de alguna copia, debido a que dicha mutación será neutral, pero aun así puede ser fijada por deriva génica. También se ha propuesto lo inverso: a partir de dos genes que recombinan de forma adecuada se genera un solo gen nuevo con dos funciones. En este caso, también es necesario un evento previo de duplicación génica, y una posterior recombinación que fusione ambas regiones génicas que pudieron ser parte de un gen activo o no, por lo que en este caso no es necesaria la acumulación de mutaciones neutrales u otros procesos de variabilidad para dar lugar a la subfuncionalización (Hughes, 1994).

Otra posibilidad es la conservación de la función en ambos genes. Esta situación, considerablemente más compleja, requiere de la duplicación perfecta de un gen existente para crear una copia redundante sin errores y evitar el silenciamiento y modificación producidos por mutaciones. Las ventajas de conservar proteínas con funciones redundantes en el genoma son beneficios debidos a la dosis de cada proteína, pleiotropía y funciones convergentes debidas a estructuras comunes (Krakauer & Nowak, 1999).

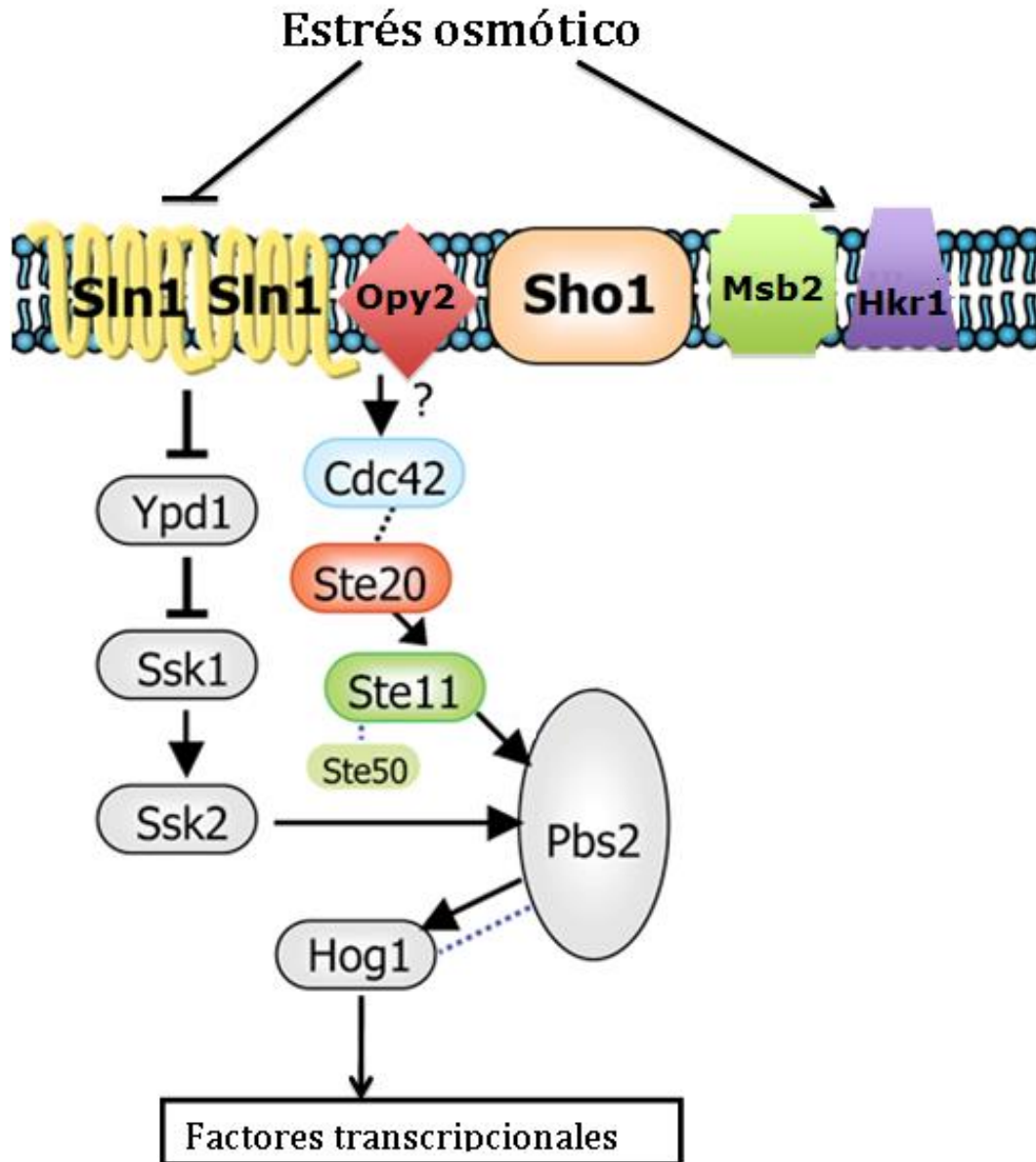
### *Vía de respuesta a estrés osmótico*

Entre las diversas condiciones ambientales a las que se enfrenta la levadura *S. cerevisiae*, existe el estrés osmótico. En esta situación, el medio extracelular tiene una concentración de soluto suficientemente alta para comprometer la turgencia de la célula, que puede desencadenar alteraciones en la estructura de la pared celular e incluso la muerte de la célula. Para adaptarse a dichas condiciones hiperosmóticas del medio la célula posee una vía de MAP cinasas llamada “vía HOG” (*High Osmolarity Glycerol*). Su nombre se debe a que para contrarrestar la hiperósmosis, produce el osmolito glicerol que incrementa la concentración intracelular de soluto y le permite estabilizarse osmóticamente.

La vía HOG se compone de 2 mecanismos que convergen en la activación de la MAPKK Pbs2p, que es la encargada de fosforilar a Hog1p, la cual a su vez migra al núcleo y activa a los factores transcripcionales de respuesta a estrés osmótico. Dichos mecanismos son las vías o ramas de SHO1 y de SLN1.

En condiciones hiperosmóticas, la vía de SLN1 regula negativamente la dimerización de Ssk1p con Ssk2p o Ssk22p mediante un sistema de fosforrelevo. Cuando el medio es isotónico, el sensor transmembranal Sln1p se autofosforila y transfiere un fosfato a la histidina fosfotransferasa (Hpt) Ypd1p, que finalmente fosforila a Ssk1p. En su estado fosforilado Ssk1p permanece en estado monomérico. En condiciones hiperosmóticas, el sistema de fosforrelevo se apaga y Ssk1p, en su estado desfosforilado, es capaz de formar un dímero con las MAPKKK's Ssk2p o Ssk22p. Ssk1p se une al dominio autoinhibitorio de Ssk2p/Ssk22p, induciendo su autofosforilación, que les permite asociarse y fosforilar a la MAPKK Pbs2p (*Figura 1*). En mutantes nulas  $\Delta sln1$ , la actividad de Ssk2p induce letalidad por la activación constitutiva de Hog1p, mientras que Ssk22p es incapaz de activarla a niveles letales. Ambos casos probablemente se deben a diferencias en su expresión o actividad, aunque esto no ha sido investigado en detalle (Posas & Saito, 1998; Posas et al., 1996; Vladimirov et al., 2003).

La segunda vía (SHO1), tiene un mecanismo distinto para activar a Hog1p. En este caso, se reclutan diferentes proteínas auxiliadas por proteínas de andamiaje, como la propia Sho1p, Opy2p y Ste50p. Hkr1p y Msb2p son propiamente los sensores de la vía, detectando cambios en el medio utilizando sus regiones ricas en serina y treonina (STR, *Serine Threonine Rich*), las cuales están altamente glicosiladas y provocan cambios conformacionales en Sho1p. Cuando Hkr1p y Msb2p se activan por condiciones hiperosmóticas, reclutan a Sho1p que se une mediante un dominio SH3 de su extremo amino a Pbs2p, la cual es activada por la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) Ste11p, además requiere a la cinasa Ste20p, la GTPasa Cdc42p y Ste50p (*Figura 1*) (Maeda et al., 1995; Raitt et al., 2000).



**Figura 1. Vía HOG de respuesta al estrés osmótico.** La figura muestra ambas ramas de la vía de respuesta a estrés osmótico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Cuando el medio es hiperosmótico, la actividad de Sln1p es suprimida, lo que hace que Ypd1p pase a su estado desfosforilado; ésto provoca la desfosforilación de Ssk1p, que forma un dímero con Ssk2p, para que ésta pueda fosforilar a Pbs2p. En la otra rama, al ser activados Msb2p y Hkr1p por el estrés hiperosmótico, activan a Sho1p que recluta a Ste11p y Pbs2p. Ste20p, que es llevado a la membrana por Cdc42p, fosforila a Ste11p que a su vez fosforila a Pbs2p. Pbs2p al ser fosforilado por cualquier rama, recluta y fosforila a Hog1p, que pasa a su forma activa, transportándose al

núcleo y activa a sus genes blanco (Modificado de Klipp & Liebermeister, 2006).

Estas dos ramas de señalización de estrés osmótico convergen en la MAPKK Pbs2p, que es fosforilada en los residuos Ser<sup>514</sup> y Thr<sup>518</sup>. La forma fosforilada de Pbs2p es la forma activa que finalmente fosforila a la MAPK Hog1p, el homólogo en la levadura de la MAP cinasa p38 activada por estrés en mamíferos.

La fosforilación de Hog1p en sus residuos Thr<sup>174</sup> y Tyr<sup>176</sup> promueve su translocación del citoplasma al núcleo mediante la proteína pequeña de unión a GTP Ran-GSP1 y el factor de importación nuclear Nmd5p. En el núcleo, Hog1p desencadena cambios en la célula, entre los que están la detención del ciclo celular, la regulación de la traducción, la inducción/represión de diversos genes y la retención y síntesis de glicerol (por lo que recibe su nombre). Hog1p modifica la transcripción de cerca del 5% de los genes de la levadura. Aunque se ha reportado que el paso de Hog1p del citoplasma al núcleo es independiente tanto de su actividad de cinasa como de su estado de fosforilación, esta última sólo cambia el equilibrio de este transporte, acelerando su paso hacia el núcleo y promoviendo su actividad transcripcional (Reiser et al., 1999).

Hog1p activa la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran *MSN1*, *MSN2* Y *MSN4*, que son factores de transcripción de respuesta general a estrés, Hot1p (*High-Osmolarity induced Transcription*), el cual se asocia al factor transcripcional Msn1p y modifica la expresión de *GPD1* y *GPD2*, genes fundamentales de la vía de síntesis de glicerol. También regula fuertemente la expresión de *STL1*, que codifica para un homólogo de la familia de los transportadores de azúcares. Para la regulación de *STL1* es dispensable la fosforilación de Hog1p, ya que también es importante su interacción con Rpb1p y Rpb2p, subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la RNA polimerasa II, que le permite reclutarla independientemente de Hot1p. Hog1p regula también a Sko1p, un represor activo de genes de respuesta a estrés osmótico, que le permite reclutar los complejos SAGA y SWI/SNF, para volverse un activador y reclutar a la RNA polimerasa II para activar la

transcripción de sus genes blanco. Por último está Smp1p, un activador transcripcional directamente activado por Hog1p y que regula la respuesta a estrés osmótico (Alepez et al., 2003; Rep, 2000; Rep et al., 1999).

Hog1p activa además (mediante su actividad catalítica) su propia represión al activar fosfatasa de serina/treonina y tirosina, entre las cuales destacan Ptp2p y Ptp3p. Ptp2p es el regulador negativo más importante; retiene y desfosforila a Hog1p en el núcleo. Ptp3p por su parte, se asocia con y desfosforila a Hog1p en el citoplasma. La inactivación de Hog1p es asegurada además mediante su exportación del núcleo hacia el citoplasma mediada por el receptor Xpo1p, que reconoce una señal de exportación nuclear (NES *Nuclear Export Sequence*). Esta retroalimentación negativa asegura que la vía HOG sólo permanezca activa en tanto persista el estrés osmótico y no se altere el estado normal de la célula cuando las condiciones del medio vuelven a la normalidad (Ferrigno et al., 1998; Mattison & Ota, 2000; Murakami et al., 2008; Reiser et al., 1999).

### *Respuesta a proteínas mal plegadas*

Las proteínas transmembranales y las que se secretan deben atravesar el retículo endoplásmico para que sean plegadas correctamente y obtengan una adecuada estructura terciaria. Sólo cuando una proteína finaliza su proceso de plegamiento adecuadamente puede salir del retículo y dirigirse a su destino final. En la levadura, ambos procesos, de plegamiento y salida del retículo, son monitoreados por distintas proteínas como Kar2p, Scj1p (Chaperonas), Pdi1p, Eug1p (Disulfuro isomerasas) y Fkb2p (Peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa). A todas ellas se les conoce como proteínas reguladas por glucosa (GRP *Glucose-Regulated Proteins*), debido a que su síntesis es activada por la privación de glucosa, pero además se activan durante diversos tipos de estrés, uno de los cuales es el estrés del retículo endoplásmico. Estas proteínas están conservadas en los eucariontes y se localizan en el lumen del retículo.

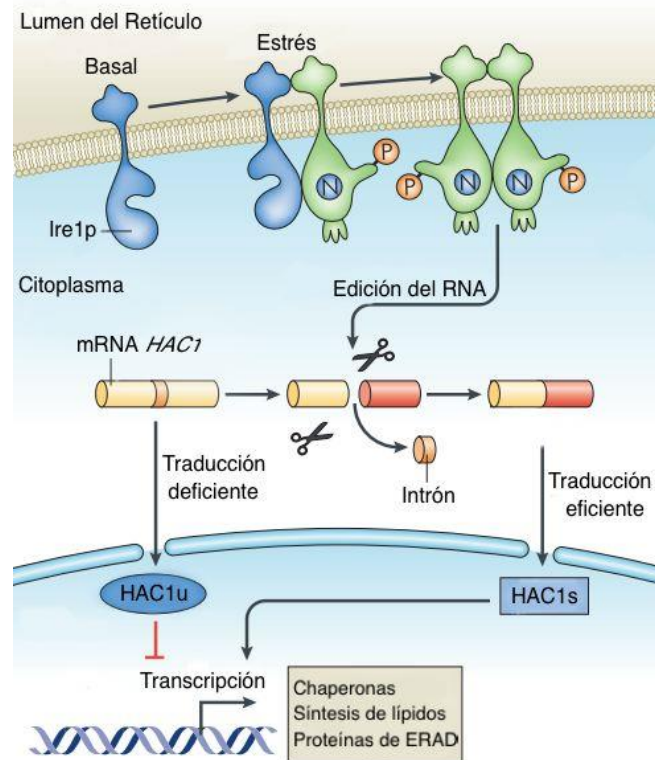
A lo largo de la vida de la célula se puede comprometer la capacidad del retículo endoplásmico para plegar proteínas. Existen diferentes condiciones que provocan este fenómeno; entre estas está la privación de glucosa, condiciones reductoras, la alteración en las concentraciones de calcio intracelular, infección viral o defectos en la glicosilación de las proteínas. La acumulación de proteínas desdobladas puede ser tóxica, por lo que la célula activa la vía UPR (*Unfolded Protein Response*) (Figura 2), cuyos efectores fueron descritos por primera vez en *S. cerevisiae*. Dicha respuesta consiste esencialmente de tres fases. La primera consiste en un cambio en la carga de proteínas que entran al retículo, disminuyendo la síntesis de proteínas y su translocación al mismo. La segunda fase es de adaptación a largo plazo y consiste en un incremento de la capacidad del retículo para contener con las proteínas desdobladas; implica la activación transcripcional de ciertos genes, entre los que están los que codifican para la maquinaria de plegamiento. Si después de estas dos fases la capacidad del retículo sigue comprometida, se inicia un tercer mecanismo, la muerte celular (Lin et al., 2007; Zhang & Kaufman, 2004b).

La acumulación de proteínas mal plegadas puede resultar de distintos tratamientos a la levadura: con tunicamicina, con 2-desoxi-D-glucosa o por privación de glucosa, que previenen la glicosilación de las proteínas. El DTT y el 2-mercaptoetanol son agentes reductores que previenen la formación de enlaces disulfuro. La sobreexpresión de proteínas mutantes que requieren la vía secretora y por lo tanto la sobrecargan y se acumulan en el retículo. Además, en células de mamífero se pueden utilizar agentes que alteren la concentración de calcio en el retículo como el A23187 o la taspigargina (Mori et al., 1996).

La tunicamicina es un antibiótico producido por *Streptomyces lysosuperficus*; su actividad principal es la inhibición de los primeros pasos de la síntesis de *N*-oligosacáridos, aunque se ha descrito que puede llegar a inhibir la síntesis de proteínas. Este antibiótico es la mezcla de diez compuestos nucleosídicos muy similares que tienen cadenas laterales de hidrocarburos de distintos tamaños (Ito et al., 1980). En *S. cerevisiae* la tunicamicina inhibe a la UDP-*N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, enzima codificada por el gen *ALG7*, que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico. La inhibición de esta enzima



induce estrés de retículo endoplásmico, aunque igualmente se ha descrito que induce arresto del ciclo celular en G1 (Arnold & Tanner, 1982; Barnes et al., 1984).



**Figura 2. Vía de respuesta a estrés por acumulación de proteínas mal plegadas.** La figura muestra la vía de respuesta a estrés de retículo endoplásmico presente en la levadura *S. cerevisiae*. En condiciones normales Ire1 se encuentra como monómero y *HAC1* es traducido con muy poca eficiencia. Cuando hay una acumulación de proteínas desdobladas y, por consecuencia, estrés de retículo endoplásmico, Ire1p se dimeriza, se transautofosforila y procesa a *HAC1* para que sea capaz de inducer la transcripción de sus genes blanco. Modificado de Ron & Walter, 2007.

En *S. cerevisiae* Ire1p y Kar2p monitorean la presencia de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico.

Ire1p es una proteína con un cruce transmembranal que reside en el retículo endoplásmico. Contiene una señal de localización para el retículo en su extremo amino-terminal, y dos dominios en su extremo carboxilo terminal, uno de actividad de cinasa de

serina/treonina y otro de endorribonucleasa. Entre estas dos regiones se encuentra una señal de localización nuclear que es reconocida por importinas. Ire1p sólo es necesaria en condiciones que promueven estrés del retículo endoplásmico, y su ausencia no interfiere con la viabilidad celular. Ire1p es capaz de percibir indirectamente la presencia de proteínas desdobladas por medio del monitoreo de la concentración de Kar2p, aunque también se ha propuesto que puede percibirla directamente, ya que según su estructura cristalográfica, al dimerizarse forma un surco similar al del complejo principal de histocompatibilidad, en el que puede caber un péptido no plegado (Shamu et al., 1994).

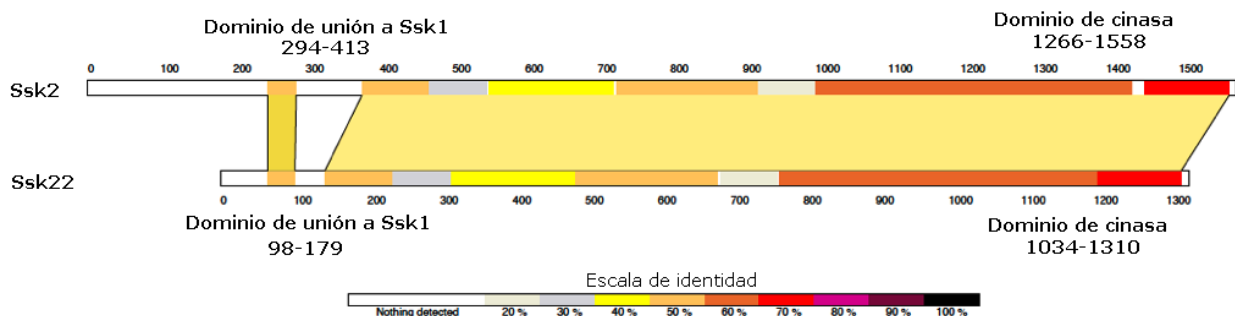
En condiciones normales, Kar2p (proteína de la familia de las chaperonas HSP70, *Heat Shock Proteins*) está asociada a la cara luminal de Ire1p; cuando la concentración de proteínas mal plegadas en el retículo aumenta, Kar2p se separa de Ire1p y se asocia a las proteínas mal plegadas. Cuando Ire1p está libre, pasa a su estado activo, se oligomeriza y transautofosforila. Esta fosforilación estimula su actividad de endorribonucleasa y procesa a *HAC1*, su único sustrato conocido. En su estado basal *HAC1* contiene un intrón que impide su traducción eficiente; éste se procesa cuando se activa la UPR y los exones son ligados por la ligasa de RNA Trl1p. Este procesamiento es independiente de la actividad del “spliceosoma”, y requiere de la presencia de una secuencia específica tallo-asa que es reconocida y procesada por Ire1p. La versión madura del mRNA de *HAC1* se traduce con una mayor eficiencia y su producto, Hac1p, un factor de transcripción con un zipper básico de leucina puede translocarse al núcleo donde se une en dímeros a secuencias de DNA de 22 pares de bases llamadas elementos de respuesta a proteínas desdobladas (UPRE) que se localizan en genes de respuesta al estrés del retículo endoplásmico, algunos de los cuales codifican para chaperonas, otros para transportadores y otros para proteínas involucradas en la síntesis de lípidos. La transcripción de esos genes permite finalmente restablecer la capacidad del retículo para plegar proteínas adecuadamente (*Figura 2*).

La UPR también controla, mediante Ire1p, la activación de la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD – *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*). La ERAD es un proceso de retrotranslocación de proteínas mal plegadas hacia el citosol, donde posteriormente son degradadas por el proteosoma. No obstante, cuando la agregación de

proteínas desdobladas es severa, la célula cuenta con una vía alternativa, la autofagia, proceso mediador de la degradación de organelos, pero cuando es inducido por la UPR se produce una degradación selectiva del retículo (Ron & Walter, 2007).

### *Ssk2 y Ssk22*

Los genes parálogos *SSK2* y *SSK22* (MAPKKK's) de *S. cerevisiae* codifican para dos proteínas involucradas en la transducción de señales en la vía HOG. *SSK2* es un gen de 4739 pares de bases que se encuentra en el cromosoma 14, mientras *SSK22* tiene 3995 pares de bases y se encuentra en el cromosoma 3. A nivel de secuencia de nucleótidos presentan un 62% de identidad, mientras que en su secuencia de aminoácidos presentan un 52.5% de identidad. Ambos genes surgieron a partir del evento de duplicación del genoma de *Saccharomyces* y son sinténicos (*Figura 3*).



**Figura 3. Ssk2p y Ssk22p.** Esquema del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Ssk2 y Ssk22 obtenido con LALNVIEW. El alineamiento se realizó con el software SIM, utilizando la matriz de comparación BLOSUM62, en el sitio de Expasy (<http://expasy.org/tools/sim-prot.html>).

En el alineamiento de la secuencia de aminoácidos se puede observar que la zona de mayor identidad entre Ssk2p y Ssk22p es el extremo carboxilo, donde se encuentra su dominio de cinasa (aminoácidos 1034-1310 en Ssk22 y 1266-1558 en Ssk2). La región adyacente tiene un buen grado de conservación, hasta llegar a la región donde se encuentra el dominio de unión a Ssk1p (Aminoácidos 294-413 en Ssk2 y 98-179 en Ssk22p). En el extremo amino Ssk2p presenta una región extra de aminoácidos.

En la base de datos de *S. cerevisiae* ("SGD Project")(al 28 de mayo de 2013) aparecen distintos dominios de unión para Ssk2p y Ssk22p. Para Ssk2p aparecen 3 dominios de unión para Sok2p (Regulador de cinasas dependientes de AMP cíclico), mientras que para Ssk22p aparecen dominios de unión para Skn7p (Segundo regulador de respuesta de la vía del fosforrelevo de SLN1), Fkh1p (Regulador negativo de la elongación de la transcripción) y Reb1p (Potenciador de la RNA polimerasa I).

La función de estas proteínas se ha descrito como redundante, aunque sólo se ha hablado de diferencias en su actividad en el sistema de transducción de HOG y en la fuerza de su interacción con Pbs2p. Sin embargo, no se ha descrito si estas diferencias son relevantes. Además de esas diferencias, que sólo se refieren a cambios en la eficiencia en la actividad de ambas proteínas, no se han descrito diferencias en los sustratos de ambas proteínas o en otras actividades (Maeda et al., 1995; Posas et al., 1996; Tatebayashi et al., 2003). Incluso en esos trabajos la mayoría de los experimentos se realizaron en un fondo de doble mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22$ , y las complementaciones se realizaron por lo general con Ssk2p.

Pero hay datos que sugieren que puede haber diferencias en el papel que tienen dentro de la célula; por ejemplo, se ha reportado sensibilidad distinta entre mutantes de *ssk2* y *ssk22* a DTT y Tm ("SGD Project," n.d.). También están anotados diferentes interactores de cada proteína en las bases de datos.

En este trabajo se presentan las interacciones de Ssk2p y Ssk22p, en diferentes condiciones de estrés y la caracterización de su participación en la resistencia a tunicamicina.

## ANTECEDENTES

Se han reportado genes parálogos involucrados en el metabolismo y en el crecimiento celular cuyas funciones han divergido a través del tiempo (Kellis et al., 2004). Entre esos genes no se encuentran *SSK2* y *SSK22*, por lo que aún se consideran redundantes. En este trabajo se describen evidencias de que para algunas funciones no son redundantes.

Se ha observado que la vía de HOG está involucrada en la respuesta a tunicamicina (Tm), ya que las mutantes de esta vía presentan sensibilidad al antibiótico. En particular se ha visto que mutantes de la rama del fosforrelevo tienen deficiencias de crecimiento en Tm, mientras que una mutante de *SHO1* crece adecuadamente. En el laboratorio observamos que las mutantes de *SSK2* y *SSK22* muestran diferentes grados de sensibilidad a la tunicamicina, por lo que nos propusimos estudiar con más detalle su participación en la respuesta a este tipo de estrés, determinando sus interacciones proteína-proteína.

## **HIPÓTESIS**

La participación de Ssk2p y Ssk22p en la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae* es redundante, pero proponemos que en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico inducida por tunicamicina actúan de forma distinta, por lo que cumplen funciones diferentes a las de la vía HOG, incluyendo además, diferencias en sus interacciones proteína-proteína.

## OBJETIVOS

- Clonar *SSK2* y *SSK22* y observar el efecto de su expresión en cepas mutantes nulas de *SSK2* y *SSK22*.
- Buscar si Ssk2p y Ssk22p están involucrados en la respuesta clásica a proteínas mal plegadas.
- Analizar si existen diferencias en las interacciones proteína-proteína de Ssk2p y Ssk22p en condiciones de estrés osmótico y estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.
- Observar si mutantes nulas de las proteínas que interactúan con Ssk2p y/o Ssk22p son sensibles al estrés de retículo endoplásmico y estrés osmótico.

## METODOLOGÍA

### *Cepas*

Se utilizaron las cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli* y BY de *S. cerevisiae* y mutantes nulas derivadas de las mismas, cuyos genotipos se muestran en la *tabla 1*.

**TABLA 1. Genotipos de las cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169(<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 GM33. LAM-IN(rrnD-rrnE)1 dam-3 sup-85</i>
BY 4741	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>
BY 4742	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>
BY 4741 <i>hog1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>hog1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>pbs2<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>pbs2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>sho1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>sho1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>hac1<math>\Delta</math> ire1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>hac1<math>\Delta</math>::kanMX4 ire1<math>\Delta</math>clonNat</i>
BY 4741 <i>ssk1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ssk1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk2<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk22<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk2<math>\Delta</math> ssk22<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4 ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>sho1<math>\Delta</math> ssk2<math>\Delta</math> ssk22<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>sho1<math>\Delta</math>::URA3 ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4 ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>rrd1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>rrd1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ubp3<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ubp3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>myo5<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>myo5<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>swr1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>swr1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>rod1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>rod1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ysc84<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>ysc84<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>lre1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ <i>lre1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>

### *Plásmidos y construcciones*

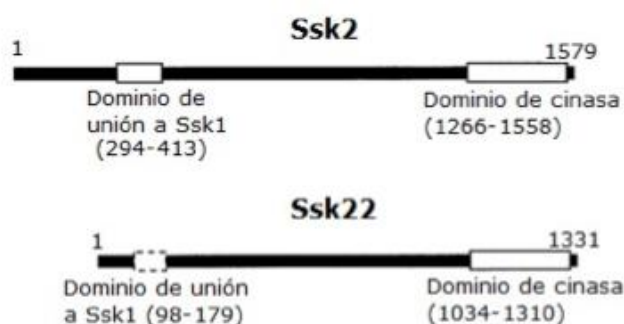
Para monitorear la activación de la UPR se utilizó el plásmido multicopia pMCZ-Y (2 $\mu$  URA3 amp<sup>R</sup>), que contiene 4 elementos UPRE dentro del promotor CYC1 fusionado al gen *lacZ* de *E. coli* (Mori et al., 1996).

Para clonar los productos de PCR se utilizó el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Las construcciones de *SSK2* y *SSK22* se hicieron en el plásmido pYES2 (Invitrogen) entre los



sitios *Bam*HI y *Xba*I. El plásmido pYES2 contiene el promotor *GAL1*, inducible con galactosa.

El gen *SSK22* se clonó mediante PCR con los oligonucleótidos FwrdSsk22BamHI (5'-GGATCCTCCATGCACCATCACCATCACCATGATATACTGATACACAGC-3') y Ssk22RevXbaI (5'-GACGTTCTAGACTCTATGAGC-3'), utilizando DNA genómico de la cepa BY 4742 como templado y una temperatura de alineamiento de 55° C (*Figura 4*). El tiempo de elongación fue de 2 minutos y 36 segundos por 10 ciclos. Posteriormente, se realizaron 18 ciclos de elongación, agregando a cada uno 5 segundos al tiempo de elongación del ciclo anterior. La temperatura de elongación fue de 68°C. Se utilizó la polimerasa del kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) con una concentración final en la mezcla de reacción de 1.5 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 4. Esquema de Ssk2p y Ssk22p.** Se muestran los dominios de unión a Ssk1 y de la cinasa, indicando la región de aminoácidos que comprende cada dominio.

### *Transformación de las levaduras*

Todas las transformaciones se hicieron de acuerdo con el método de acetato de litio (Amberg et al., 2005). Las células que se transformaron fueron tomadas a partir de un cultivo de toda la noche a 30° C, que fue ajustado a una DO<sub>600</sub>=0.5 para crecerlo durante 2 horas antes de iniciar el protocolo de transformación.

## *Transformación de bacterias*

Se empleó el protocolo utilizado por Inoue et al. (1990).

## *Condiciones y medios de cultivo*

Las células se crecieron durante toda la noche a 30°C en medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa). En los ensayos de diluciones seriadas se utilizó YPD o YPGAL en el que se sustituye glucosa con galactosa. En todos los ensayos de crecimiento se utilizó YPD.

Para los ensayos de complementación de fragmentos de proteínas se utilizó medio SC que contiene 0.67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 2% de glucosa, 2% de agar y 2% de la mezcla de aminoácidos requerida.

En el caso de medio sólido se agregó 2% de agar, excepto para los medios adicionados con KCl, en cuyo caso se utilizó 2.25%.

La solución stock utilizada de tunicamicina fue de 20 mg/mL diluida en DMSO. La solución stock de metotrexato (Bioshop) tiene una concentración de 10 mg/mL diluida en DMSO.

Las células de *E. coli* se cultivaron a 37°C en medio LB (1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl) suplementado con ampicilina (0.1 mg/mL). El medio sólido contiene además 2% de agar.

## *Ensayos de diluciones seriadas*

Los ensayos de diluciones seriadas se realizaron en medio agar YPD/YPGAL complementado con la cantidad indicada de KCl, tunicamicina (Tm), 2-mercaptoetanol, sorbitol, ditionitrito (DTT).

Un cultivo líquido de levaduras crecido durante toda la noche a 30°C se diluyó a una densidad óptica  $DO_{600}=0.5$  y se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10. A partir de cada dilución se inocularon en las placas gotas de 5  $\mu$ l cada una y se crecieron durante ~36 horas a 30°C.

### *Ensayos de crecimiento*

Se utilizó un lector de microplacas Synergy MX® que registró la densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de una placa de 96 pozos cada 30 minutos durante 24 horas. La DO<sub>600nm</sub> inicial fue de 0.1. Estos ensayos se realizaron por triplicado en medio YPD adicionado con tunicamicina o KCl.

### *Ensayos de actividad de β-galactosidasa*

Las cepas BY 4741, BY 4741 *hog1Δ*, BY 4741 *ssk2Δ ssk22Δ* y BY 4741 *hac1Δ ire1Δ*, se transformaron con el plásmido pMCZ-Y. Posteriormente se crecieron durante toda la noche a 30°C en medio YPD, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>≈0.5, posteriormente las células se indujeron por 60, 90, 120 y 180 minutos mediante 2 µg/ml de tunicamicina. Las células se lavaron con agua y buffer Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl y 1 mM MgSO<sub>4</sub>). Se extrajo la proteína total y se indujo la actividad en una solución con buffer Z, β-mercaptoetanol y *o*-NPG por 20 minutos a 30°C; posteriormente se detuvo la reacción con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se cuantificó la actividad de la β-galactosidasa midiendo la absorbencia a 420 nm (Miller, 1972). El cálculo de actividad se realizó con la siguiente fórmula: Actividad (Expresada en unidades Miller) = 1000 (Volumen total de reacción) / (ε*o*-NPG \* Vol (valorado) \* tiempo de reacción \* mg/ml Proteína). Una unidad Miller se define como la cantidad de enzima capaz de convertir 1 nmol de *o*-NPG por minuto en las condiciones del ensayo.

La cantidad de proteína en las muestras se cuantificó mediante el método de Bradford. Los ensayos fueron hechos por triplicado.

Para disminuir la variación en las lecturas, los cultivos se tomaron con un máximo de diferencia en la DO<sub>600</sub> de +/- 0.03.

### *Ensayo de complementación con fragmentos de proteínas.*

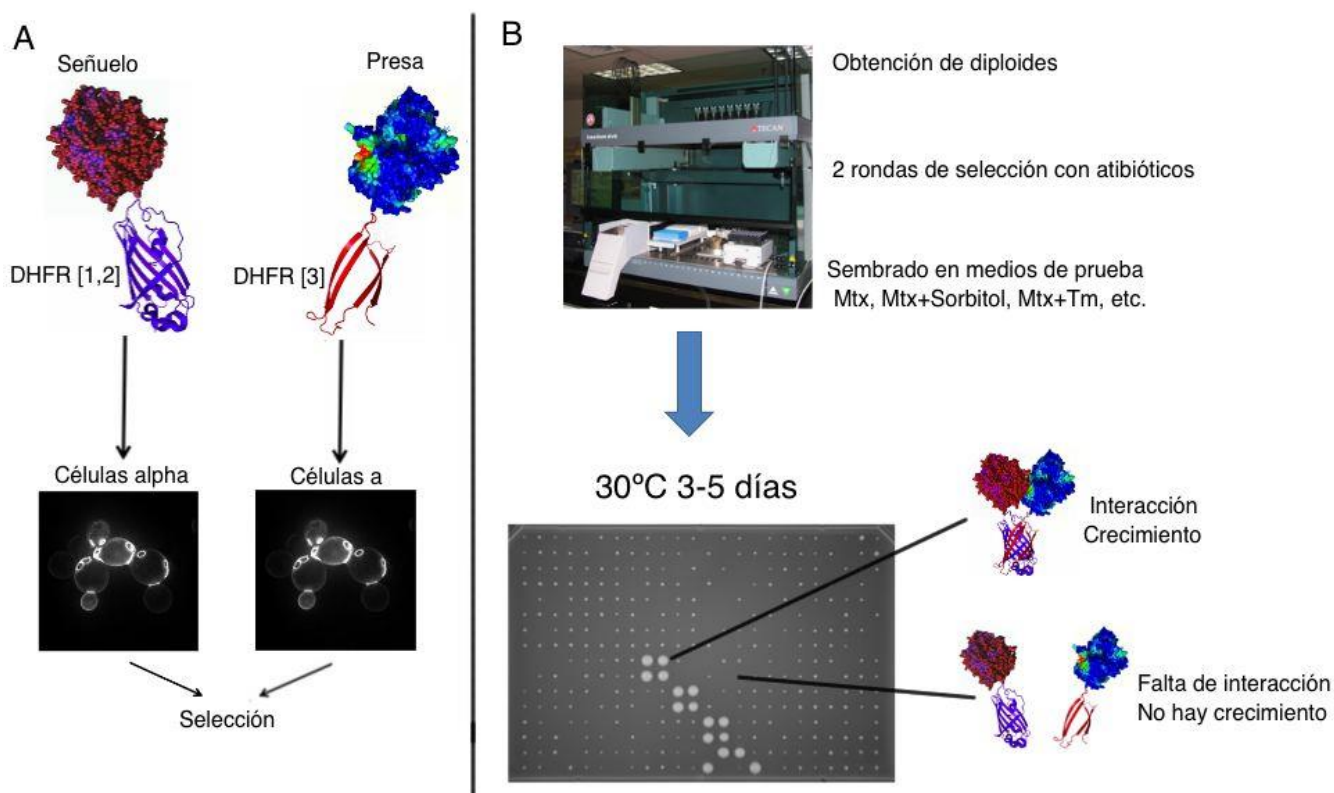
Se utilizó una genoteca de BY4741 y BY4742 transformadas con los fragmentos de DHFR[1,2] y DHFR[3] (Tarassov et al., 2008a), respectivamente, fusionados a las proteínas del genoma de *S. Cerevisiae*. Se utilizaron las construcciones de DHFR[1,2] fusionadas a *SSK2*, *SSK22*, o *HOG1*, que sirvieron como señuelo. Como presa se utilizaron diversas construcciones disponibles de la biblioteca de DHFR[3]. La selección de estas construcciones se basó en las interacciones reportadas previamente para ambos genes en la base de datos de *Saccharomyces* (<http://www.yeastgenome.org/>) y en la base de datos de interacciones genéticas y de proteínas (<http://thebiogrid.org/>). Además, se seleccionaron tomando en cuenta proteínas que forman parte de las vías de respuesta a estrés de retículo endoplásmico, estrés de pared celular y estrés osmótico.

Las clonas de cada construcción se seleccionaron en medio YPD con nurseotricina (Para construcciones de DHFR [1,2]) o kanamicina (Para DHFR [3]). Se realizaron 2 rondas de selección, permitiendo a las células crecer durante 24 horas entre cada ronda de selección. Posteriormente, las células BY 4741 (Que contenían la construcción DHFR [3] se imprimieron en medio YPD en un formato de 384 colonias, utilizando un robot Freedom Evo 75-100® (Tecan), y se aparearon con las células que contenían la construcción DHFR [1,2] fusionada a *SSK2*, *SSK22* o *HOG1*. Se dejaron crecer las células diploides por 48 horas y posteriormente se replicaron en medio SC lys<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>, ade<sup>-</sup>, adicionados con kanamicina y nurseotricina. Se realizaron dos rondas de selección con estos antibióticos y finalmente se replicaron en medio SC para llevar a cabo el ensayo. Como controles se replicaron las células en medio SC, y SC adicionado con DMSO (Vehículo del metotrexato) al 2% o metotrexato al 2% (*Figura 5*).

El ensayo se realizó induciendo estrés osmótico, con 0.5 ó 1 M de sorbitol. Para inducir estrés de retículo endoplásmico se utilizó tunicamicina a una concentración de 0.75 o 0.5 µg/ml.

Después de replicar las células diploides en los diversos medios, se dejaron crecer a 30°C durante de 3 a 5 días según el crecimiento observado en las colonias control.

Posteriormente se fotografiaron las placas y las imágenes se analizaron con un script de ImageJ64 ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). Los datos arrojados por este script se normalizaron y graficaron en un heatmap hecho con el lenguaje de programación estadístico “R64” versión 3.0.2 (“The R Project for Statistical Computing”). El ensayo se realizó por duplicado, y para realizar el análisis de los datos se hizo un promedio de los datos de cada interacción. Posteriormente se graficó la relación entre los datos del tamaño de las colonias en las diversas condiciones respecto al crecimiento de las colonias en presencia de metotrexato (condición control).



**Figura 5. Ensayo de PCA utilizando a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).** A. Se selecciona la cepa del tipo Mat- $\alpha$  que contiene la proteína señuelo asociada al fragmento [1,2] de la dihidrofolato reductasa. Posteriormente se seleccionan las cepas del tipo Mat  $\alpha$  que contienen las proteínas asociadas al fragmento [3] de la DHFR con las que se quiere probar la posible interacción.

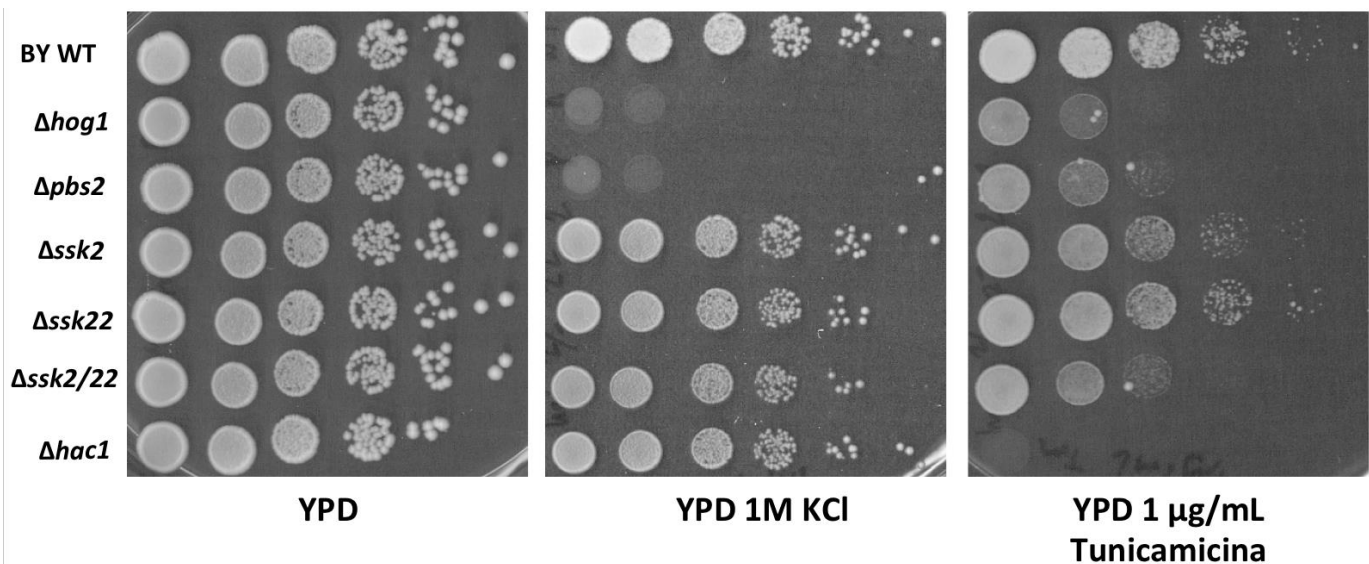
B. Mediante un sistema automatizado se cruzan las células para obtener diploides que contienen ambos fragmentos de la DHFR asociados a las

proteínas blanco y se realizan dos rondas de selección utilizando antibióticos. Finalmente las células se replican en los medios con las distintas condiciones en que se quieren observar las interacciones de las proteínas de interés.

## RESULTADOS

### *Existe un fenotipo distinto entre las mutantes $\Delta ssk2$ y $\Delta ssk22$*

Como previamente ha sido descrito, las mutantes nulas de los genes de la rama de SLN1 de respuesta a estrés osmótico (río abajo de Ypd1p), no presentan un fenotipo letal al crecer en altas concentraciones de sal, debido a que la célula cuenta con la rama de SHO1 para contender con este tipo de estrés (Reiser et al., 2003; Tatebayashi et al., 2007). No obstante, en el laboratorio observamos que en presencia de tunicamicina, un agente inductor de estrés de retículo endoplásmico, las mutantes nulas de Ssk2p y Ssk22p y la mutante nula doble de Ssk2p/Ssk22p presentan un fenotipo diferente de sensibilidad respecto a la cepa silvestre, al menos en la concentración que utilizamos para el ensayo (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 6 y S1).



**Figura 6.** Diluciones seriadas 1:10 de mutantes de la rama de SLN1 de respuesta al estrés osmótico. Las células se sembraron en medio YPD con KCl, tunicamicina o 2-desoxi-d-glucosa según se indica. Los cultivos de cada cepa se crecieron toda la noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. Posteriormente se hicieron 5 diluciones 1:10 y se sembró una

gota de 5  $\mu$ L de cada dilución en los distintos medios. Las cajas se incubaron 30°C durante ~36 horas.

A pesar de que Ssk2 y Ssk22 se han descrito como redundantes en la vía HOG (Posas et al., 1996; Tatebayashi et al., 2003), en el ensayo de resistencia a Tunicamicina (Tm), se observó que la mutante  $\Delta$ ssk2 es sensible, mientras que con la mutante  $\Delta$ ssk22 no se observó ningún efecto. (Figura 6 y S1). La diferencia en el comportamiento de las cepas  $\Delta$ ssk2 y  $\Delta$ ssk22 sugiere que la función de Ssk2p y Ssk22p es distinta para responder a la tunicamicina, a pesar de que en la respuesta a estrés osmótico cumplen papeles redundantes.

Además de la diferencia entre las cepas  $\Delta$ ssk2 y  $\Delta$ ssk22, pudimos observar que la resistencia parece ser aditiva, ya que una mutante doble  $\Delta$ ssk2/ $\Delta$ ssk22 es más sensible que una mutante sencilla  $\Delta$ ssk2 o una  $\Delta$ ssk22. Esta última observación puede indicar que la vía no es lineal, como sucede en el caso de la rama de SLN1 de respuesta al estrés osmótico, donde actúan de esta forma.

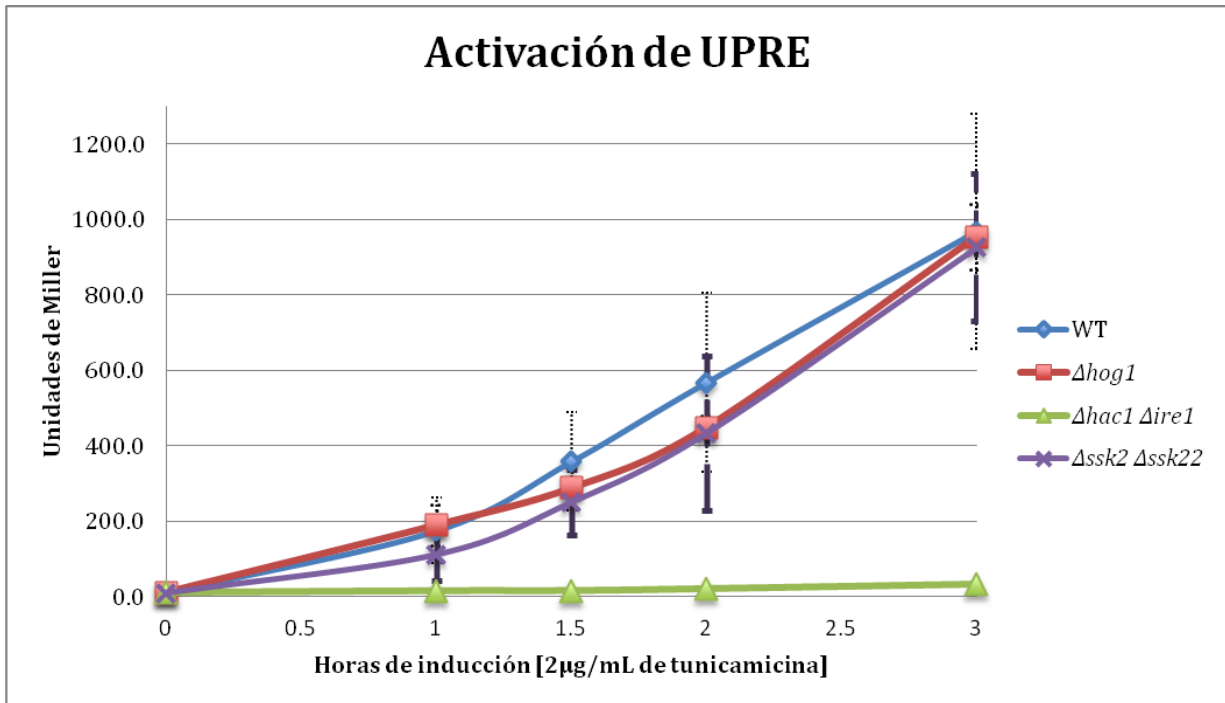
### *La respuesta a tunicamicina mediada por Hog1p y Ssk2p/Ssk22p no activa la UPR*

Después de observar el fenotipo de sensibilidad a tunicamicina de las diferentes mutantes decidimos investigar si estas mutantes se encuentran afectadas en su capacidad para inducir la vía clásica de UPR (Figura 2).

La activación de la UPR, se determinó mediante un gen reportero clonado en el plásmido pMCZ-Y, que consiste en el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control de 4 copias del elemento de respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE) (Mori et al., 1996). Las cepas  $\Delta$ hog1,  $\Delta$ ssk2/22,  $\Delta$ hac1  $\Delta$ ire1 y silvestre se transformaron con el plásmido pMCZ-Y y, a partir de cultivos saturados de toda la noche en medio YPD; se tomó un volumen adecuado para incubarse toda la noche hasta tener una densidad óptica D.O.<sub>600nm</sub>≈0.5. Estas células se incubaron durante 60, 90, 120 o 180 minutos en presencia de 2  $\mu$ g/mL de tunicamicina.



Posteriormente se midió la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa como se describe en “Materiales y métodos”.



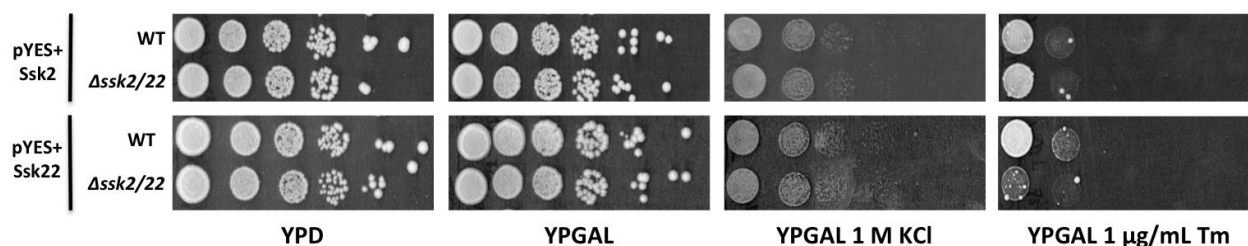
**Figura 7. Ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa (expresada en unidades Miller) en las cepas BY WT (Silvestre),  $\Delta ssk2/22$ ,  $\Delta hog1$  y  $\Delta hac1 \Delta ire1$  en el fondo genético BY, en el tiempo 0 y después de 60, 90, 120 y 180 minutos de estimulación con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina. Los datos presentados en la gráfica corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado.

Los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa mostraron que la activación del UPRE no disminuye en ausencia de Hog1p o de las proteínas Ssk2p y Ssk22p (Figura 7). De hecho, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa es comparable a la que muestra la cepa silvestre. En cambio la mutante carente de las proteínas que activan la vía UPR ( $\Delta hac1 \Delta ire1$ ) no muestran actividad del gen reportero.

Esto sugiere que el defecto en las mutantes de la vía de HOG, radica en un sistema diferente a la UPR, pero que también es importante para responder adecuadamente al antibiótico.

### *Ssk2p y Ssk22p no son equivalentes en ensayos de complementación*

Los ensayos previos que sugirieron la participación diferencial de Ssk2p y Ssk22p en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico, nos llevaron a intentar describir más a fondo cómo se involucran estas dos proteínas en la respuesta a tunicamicina. En esta parte del trabajo, se clonaron versiones silvestres de *SSK2* y *SSK22* en el vector de sobreexpresión pYES2 (*Invitrogen*) y posteriormente las construcciones fueron introducidas en distintas cepas de levaduras, para determinar la respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducida por tunicamicina.

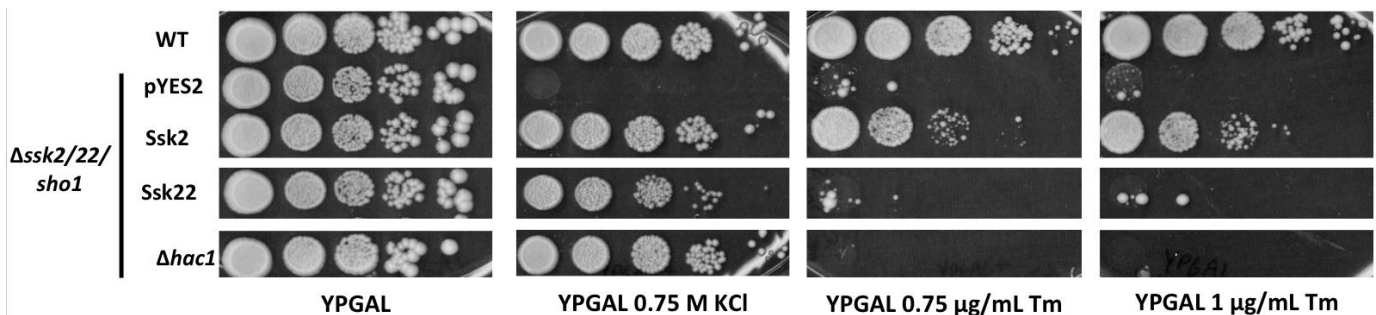


**Figura 8.** Diluciones seriadas 1:10 de mutantes de la rama de SLN1 de respuesta a estrés osmótico, complementadas con Ssk2 o Ssk22 dentro del plásmido pYES2. Las células fueron sembradas en medio YPD o YPGAL con KCl o tunicamicina según se indica. Los cultivos de cada cepa se crecieron toda la noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. Posteriormente se hicieron 5 diluciones 1:10 y se sembró una gota de 5 μL de cada dilución en los distintos medios. Las cajas se incubaron 30°C durante ~36 horas. El plásmido pYES2 contiene un promotor inducible por galactosa (GAL1), por lo que las cepas se incubaron en YPGAL para inducir la expresión de las distintas construcciones.

La complementación con Ssk2p y Ssk22p tuvo efectos distintos sobre mutantes nulas  $\Delta ssk2\Delta ssk22$  (" $\Delta ssk2/22$ ") (Figura 8). La complementación con Ssk2p en presencia de tunicamicina tuvo un efecto más notorio en restablecer el crecimiento de la mutante y

$\Delta ssk2/22$ , en comparación con el ensayo de complementación realizado con Ssk22p, donde, aunque se observó un restablecimiento del crecimiento de las cepas mutantes, no fue tan bueno como el inducido por Ssk2p (Figura 8 y S2). Este comportamiento de las cepas en los ensayos de complementación sugiere que Ssk2p tiene un papel más importante en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina. En el caso de la respuesta a estrés osmótico (inducido con KCl), no se notaron diferencias en el crecimiento de las cepas (Figura 8 y S2), lo que puede indicar que en esta respuesta son redundantes, o simplemente puede ser que ambas cepas cuentan con la rama de SHO1 para responder a ese estrés.

Debido a que observamos una posible interferencia de la rama de SHO1 en nuestros resultados de los ensayos de complementación, realizamos nuevos ensayos en una cepa carente de ambas ramas de la vía HOG; es decir, una mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta sho1$ . Dicha cepa fue transformada con las versiones silvestres de SSK2 y SSK22 y posteriormente sembrada en condiciones de estrés osmótico (KCl) o estrés de retículo endoplásmico (Tunicamicina).



**Figura 9.** Diluciones seriadas 1:10 de mutantes  $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta sho1$ , complementadas con Ssk2p o Ssk22p silvestres dentro del plásmido pYES2, o con el plásmido vacío. Las células fueron sembradas en medio YPGAL adicionado con KCl o tunicamicina según se indica. Los cultivos de cada cepa se crecieron toda la noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. Posteriormente se hicieron 5 diluciones 1:10 y se sembró una gota de 5  $\mu$ L de cada dilución en los distintos medios. Las cajas se incubaron 30°C durante ~36 horas. El plásmido pYES2 contiene un promotor inducible por galactosa (GAL1), por lo que las cepas se incubaron en YPGAL para inducir la expresión de las distintas construcciones.

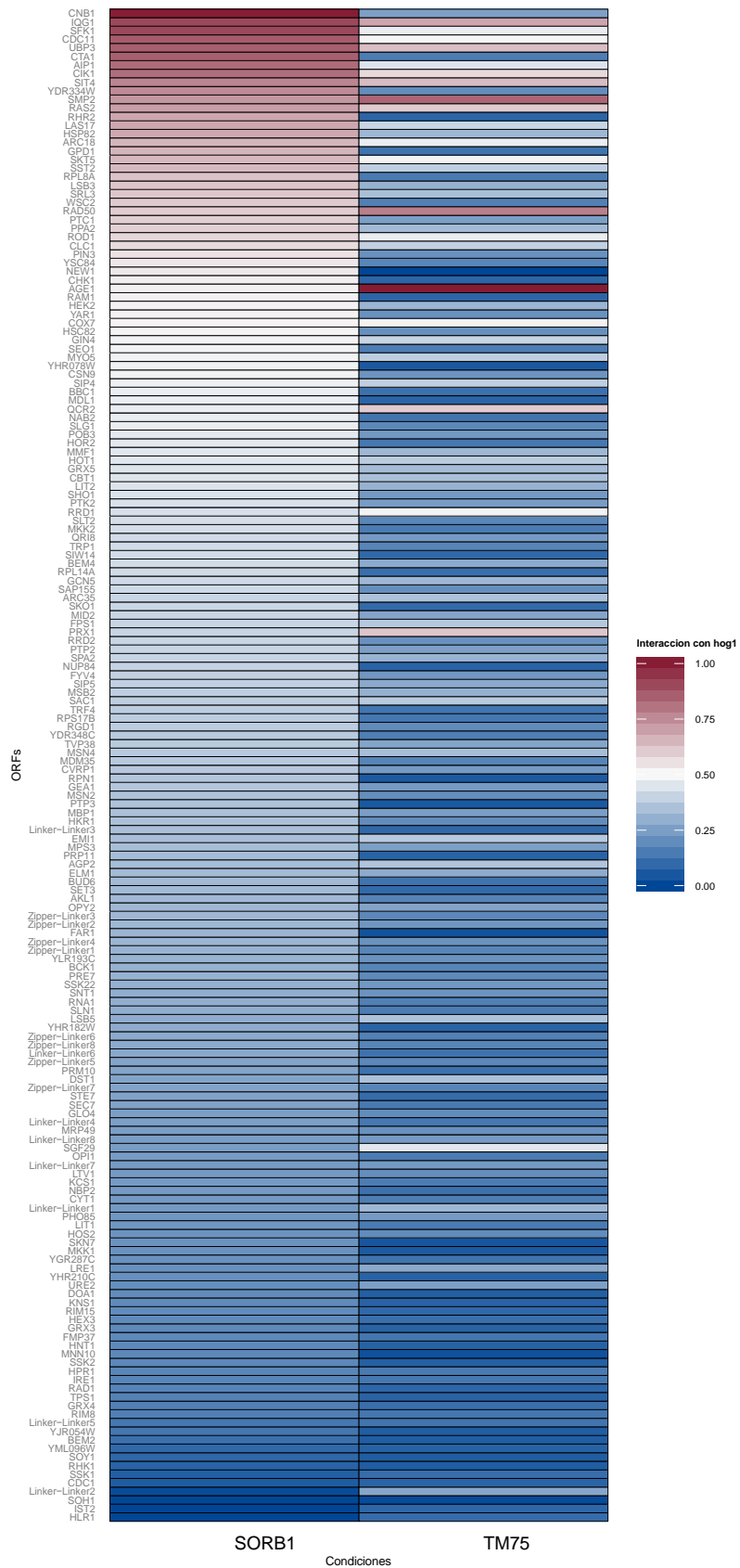
En el ensayo de complementación observamos diferencias en la capacidad de Ssk2p y Ssk22p, para complementar a la mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta sho1$  ( $\Delta ssk2/22/sho1$  en *Figura 9*) en presencia de tunicamicina. En el caso del estrés osmótico, observamos una ligera diferencia en la complementación con Ssk2p o Ssk22p, aunque ambas restablecieron el crecimiento de la cepa a niveles comparables con la cepa silvestre. En cambio, en medios con Tm observamos que sólo Ssk2p fue capaz de restablecer el crecimiento de nuestra mutante, mientras que la expresión de Ssk22 no tuvo ningún efecto (*Figura 9*).

*Las interacciones de Ssk2p y Ssk22p con otras proteínas en diversas condiciones de estrés son distintas.*

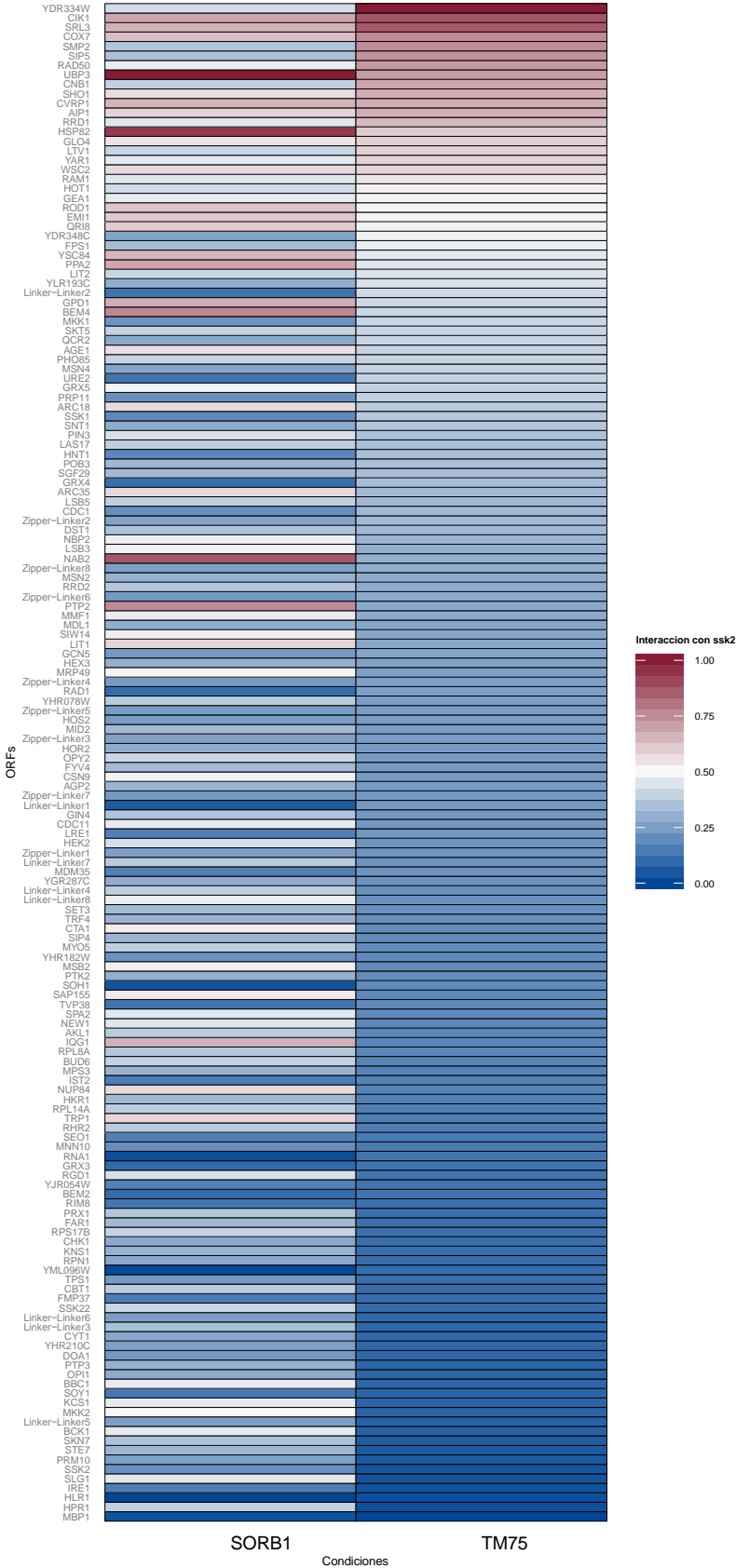
En un intento para determinar más diferencias en la participación de Ssk2p y Ssk22p en la respuesta a la tunicamicina, realizamos un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas (PCA) (Remy et al., 2007; Subramaniam et al., 2008) a gran escala, utilizando tanto a Ssk2p como a Ssk22p como anzuelos. Realizamos además un ensayo en el que se utilizó a Hog1p, ya que previamente se han realizado diversos experimentos a gran escala de las interacciones de esta proteína en respuesta al estrés osmótico (Costanzo et al., 2010; Maeda et al., 1994; Murakami et al., 2008; Warmka et al., 2001), lo que nos permitió comprobar la sensibilidad de nuestro ensayo y su confiabilidad, ya que la técnica de PCA no se había utilizado previamente para reportar interacciones ante cualquier tipo de estrés.

En el ensayo se incluyeron las siguientes construcciones como controles: La condición *Linker-Linker* que incluye a los plásmidos p413-TEF-linker-DHFR F[3] y p413-TEF-linker-DHFR F[1,2] que se emplean como control de no-interacción y la condición *Zipper-Linker* que incluye a los plásmidos p413-TEF-Zip-linker-DHFR F[3] y p413-TEF-Zip-linker-DHFR F[1,2] (*Figura 5*), que se emplean como control positivo de interacción. En esta condición las colonias crecen en presencia de metotrexato (*Figura 12*). Esta construcción contiene los residuos 235-281 del zipper de leucinas de GCN4 (Pelletier et al., 1998).

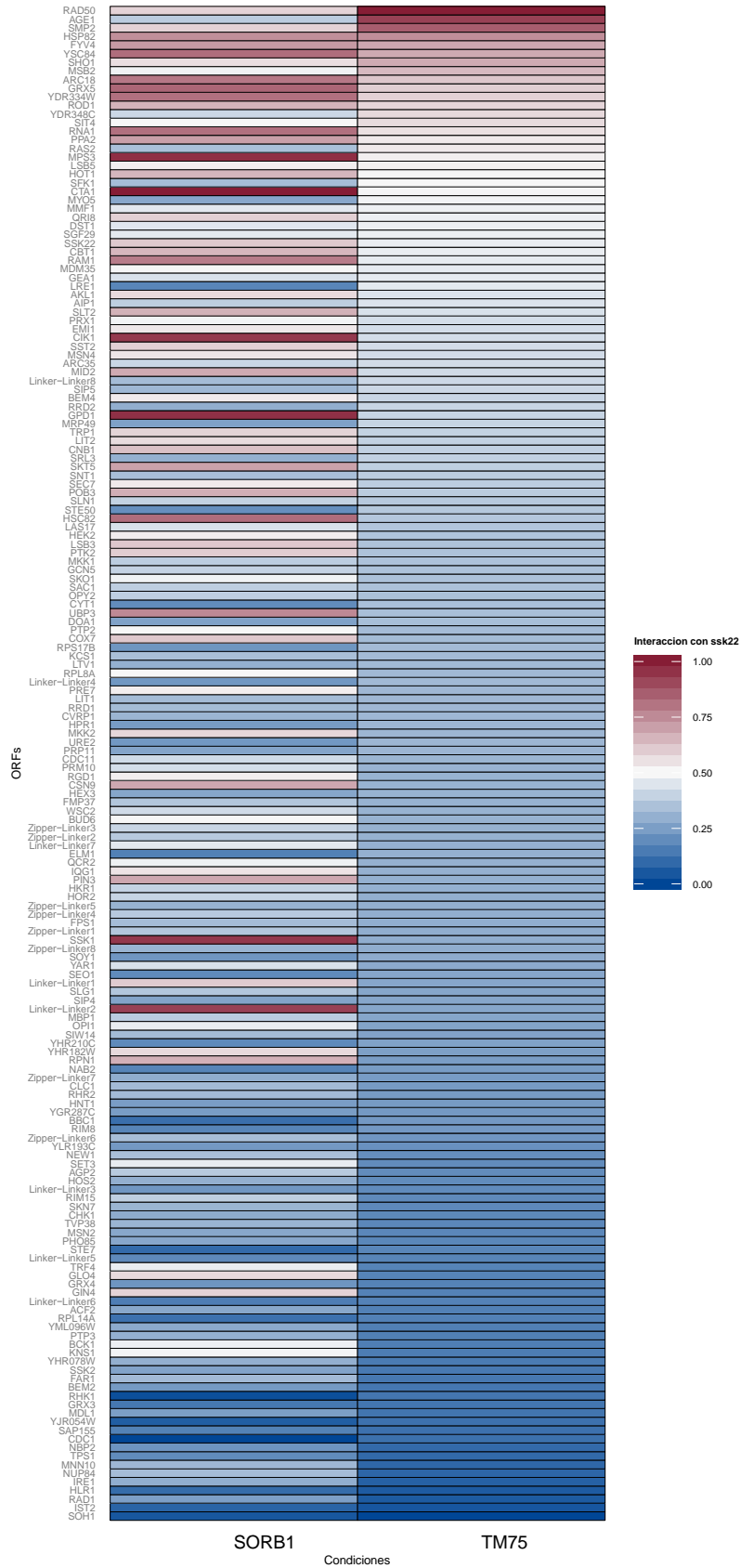
a) Interacciones de Hog1p en presencia de sorbitol (SORB1) y tunicamicina (TM75)



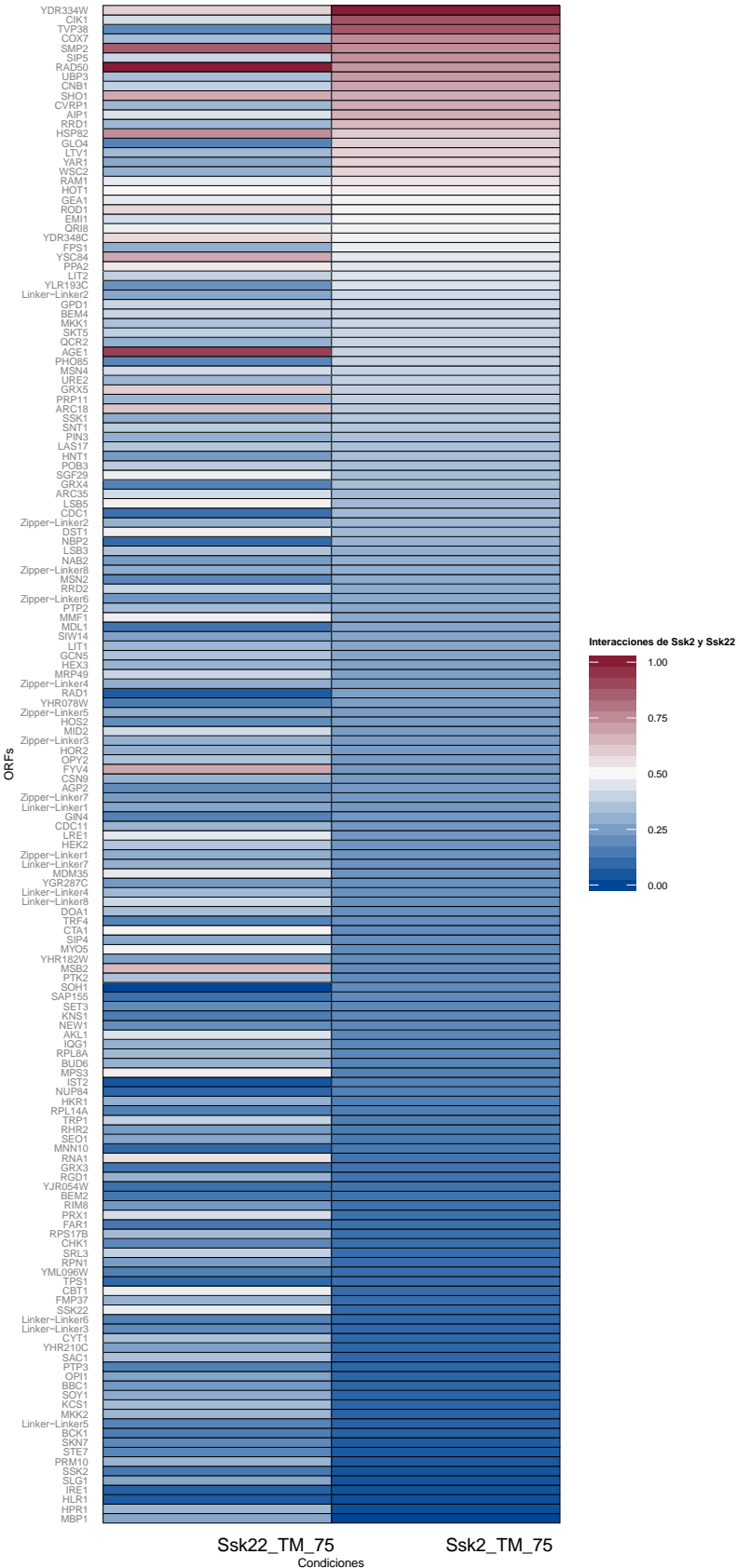
**b) Interacciones de Ssk2p en presencia de sorbitol (SORB1) y tunicamicina (TM75)**



### c) Interacciones de Ssk22p en presencia de sorbitol (SORB1) y tunicamicina (TM75)



d) Interacciones de Ssk2p y Ssk22p en presencia de tunicamicina (TM 75)





**Figura 10. Interacciones proteína-proteína para Hog1p, Ssk2p y Ssk22p.**

Las interacciones se midieron mediante un ensayo de PCA en presencia de 1 M de sorbitol (SORB1) o 0.75 µg/mL de tunicamicina (TM75). Las imágenes de las colonias resultantes del ensayo se digitalizaron y cuantificaron, y en la imagen se muestran heatmaps de la intensidad de dichas interacciones. Las intensidades de las interacciones se muestran en el código de color marcado en la regla del lado derecho de cada conjunto de interacciones, donde se asignó un valor de 1 a la más intensa y 0 a la más débil, se generó una rampa de color de rojo (Valor más alto) hasta azul (Valor más bajo). Los detalles de los colores elegidos y el script utilizado para generar el heatmap se muestran en el *apéndice 2*.

El mapa de interacciones de Hog1p mostró algunas previamente reportadas en la respuesta al estrés osmótico. Algunas de ellas son Ubp3p (Solé et al., 2011), Cdc11p (Costanzo et al., 2010), Ptc1p (Warmka et al., 2001) y Hsp82p (Ho et al., 2002) (*Figura 10 a*). En diversos trabajos se describe que esas proteínas son requeridas durante la respuesta al estrés osmótico, además de que interactúan con Hog1p, lo que indica que nuestro ensayo es capaz de detectar proteínas que interactúan con Hog1p durante el estrés osmótico. En la *Tabla 2* se resumen los principales interactores observados en el ensayo de PCA para Hog1p, Ssk2p y Ssk22p en presencia de tunicamicina.

**TABLA 2. Principales interactores de Hog1p, Ssk2p y Ssk22p** en presencia de tunicamicina, de acuerdo con los resultados del ensayo de PCA. Los interactores se ordenaron según la intensidad de su interacción. Se indica con “+” los interactores exclusivos de Ssk2p.

<b>Interactores de Hog1p</b>	
<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
Ubp3p	Ubiquitín proteasa
Cdc11p	Requerida para citocinesis
Ptc1p	Fosfatasa reguladora de Hog1p
Hsp82p	Chaperona requerida para respuesta a feromonas
<b>Interactores de Ssk2p</b>	
Swr1p	Componente del complejo SWR1
†Srl3p	Sustrato potencial de Cdc28p
Smp2p	Fosfatasa involucrada en la síntesis de lípidos
†Vrp1p	Proteína asociada a actina
†Ubp3p	Ubiquitín proteasa
Sho1p	Sensor vía HOG
<b>Interactores de Ssk22p</b>	
Smp2p	Fosfatasa involucrada en la síntesis de lípidos
Hsp82p	Chaperona requerida para respuesta a feromonas
Ysc84p	Proteína de unión a actina
Sho1p	Sensor vía HOG
Swr1p	Componente del complejo SWR1
Myo5p	Miosina tipo 1

Los heatmaps sugieren que las interacciones de Ssk2p son más numerosas en condiciones de estrés osmótico (Sorbitol 1M) y del retículo endoplásmico (0.5 y 0.75 µg/mL de Tunicamicina), ya que se obtuvo un mayor número de valores altos para las interacciones de esta proteína. Por otro lado, Ssk22p presenta interacciones con proteínas que no se

observaron en niveles importantes con Ssk2p, lo que sugiere que sí existen diferencias en algunas condiciones en las interacciones de estas proteínas (*Figura 10 b y c*). Aunque los ensayos se realizaron en presencia de otros inductores de estrés de retículo endoplásmico, como  $\beta$ -mercaptoetanol, y DTT, sólo se muestran los resultados en presencia de tunicamicina y sorbitol para mayor simplicidad. Cabe destacar que en dichas condiciones, en general, las interacciones de Ssk2p fueron más numerosas que las presentadas en Ssk22p. Al comparar las interacciones observadas para Ssk2p y Ssk22p en presencia de 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina, se puede observar que las interacciones de Ssk2p son más intensas (*Figura 10 d*).

La comparación de las interacciones proteína-proteína de Ssk2p con Ssk22p nos permite observar que hay diferencias importantes en la intensidad de las interacciones con proteínas como Rrd1p y Ubp3, que en el caso de Ssk2p tuvieron una intensidad importante, mientras que para Ssk22p, la interacción fue más débil o incluso no se detectó. Esta observación indica que hay diferencias importantes en las interacciones que tienen Ssk2 y Ssk22 en presencia de Tm lo que sugiere fuertemente que su papel en la respuesta al antibiótico es muy diferente.

Es importante aclarar que aunque pueden observarse estas diferencias, pueden deberse no necesariamente a su interacción directa, ya que los resultados del experimento pueden reflejar la complementación de la DHFR provocada entre Ssk2p/Ssk22p cuando están unidos a alguna proteína que a su vez se asocia a la proteína “presa”, que es la que tiene el segundo fragmento de la DHFR. A pesar de esto, los resultados son buenos indicadores de las proteínas, o los componentes de los complejos proteicos que participan en la respuesta a tunicamicina para responder al estrés de retículo endoplásmico.

### *Las mutantes nulas de los interactores de Ssk2p y Ssk22p son sensibles a inductores de estrés de retículo endoplásmico*

Basados en los resultados del ensayo de PCA, seleccionamos algunas mutantes nulas de las principales proteínas que interactúan con Ssk2p y Ssk22p para comprobar si también

estaban afectadas en su capacidad de responder a diversos inductores de estrés de retículo endoplásmico.

Las mutantes se muestran a continuación en la *Tabla 3*:

**TABLA 3. Lista de mutantes nulas seleccionadas del ensayo de PCA.** Se muestran dos columnas, para las que interactúan con Ssk2p y Ssk22p en presencia de tunicamicina. Además se indica si son sensibles (✓) o no (✗) a sal y tunicamicina, de acuerdo con la base de datos de *S. cerevisiae* ("SGD Project," <http://www.yeastgenome.org/>, accesado en abril, 2014). *Nd*, no disponible.

Ssk2p				Ssk22p			
Gen	Función	Sensibilidad		Gen	Función	Sensibilidad	
		Sal	Tm			Sal	Tm
<i>SWR1</i>	Complejo Swi2/Snf2	✓	nd	<i>SWR1</i>	Complejo Swi2/Snf2	✓	nd
<i>VRP1</i>	Asociada a actina	✓	✗	<i>YSC84</i>	Proteína de unión a actina	nd	nd
<i>UBP3</i>	Ubiquitin proteasa	nd	✓	<i>LRE1</i>	Respuesta general al estrés	nd	nd
<i>RRD1</i>	Peptidil-prolil isomerasa cis/trans	nd	✓	<i>SHO1</i>	Sensor vía HOG	✓	✗
<i>SHO1</i>	Sensor vía HOG	✓	✗	<i>ROD1</i>	Reciclaje de proteínas membranales	nd	nd
<i>ROD1</i>	Reciclaje de proteínas membranales	nd	nd	<i>MYO5</i>	Miosina tipo 1	nd	nd

Después de la obtención de las cepas mutantes se hicieron ensayos de diluciones seriadas para comprobar los diversos fenotipos de sensibilidad reportados en la SGD.



**TABLA 4. Lista de mutantes nulas seleccionadas del ensayo de PCA.** Se indican los fenotipos encontrados en el ensayo de diluciones seriadas (*Figura 13A y B*).

<b>Cepa</b>	<b>KCl 0.75 M</b>	<b>Tm 0.75 µg/mL</b>	<b>Interactor</b>
<b><i>Δhog1</i></b>	Sensible	Sensible	-
<b><i>Δssk2</i></b>	No sensible	Sensible	-
<b><i>Δssk22</i></b>	No sensible	Sensible	-
<b><i>Δvrp1</i></b>	Sensible	No sensible	Ssk2p
<b><i>Δubp3</i></b>	No sensible	Sensible	Ssk2p
<b><i>Δrrd1</i></b>	No sensible	Sensible	Ssk2p
<b><i>Δrod1</i></b>	No sensible	No sensible	Ssk22p
<b><i>Δlre1</i></b>	No sensible	No sensible	Ssk22p
<b><i>Δswr1</i></b>	No sensible	No sensible	Ssk2p
<b><i>Δysc84</i></b>	No sensible	No sensible	Ssk2p/Ssk22p
<b><i>Δmyo5</i></b>	No sensible	No sensible	Ssk22p

Como se puede apreciar en la Tabla 4, de las cepas que utilizamos en el ensayo de diluciones seriadas, las mutantes *Δubp3* (Ubiquitin proteasa) y *Δrrd1* (Peptidil-proli cis/trans isomerasa) presentaron un comportamiento similar a las cepas *Δhog1*, *Δssk2* y *Δssk22* en presencia de tunicamicina. El comportamiento de estas cepas sugiere que están involucradas en la respuesta a tunicamicina, ya que sabemos que interactúan de manera importante con Ssk2p para responder al estrés de retículo endoplásmico.

## DISCUSIÓN

### *La función de los genes parálogos SSK2 y SSK22 no es redundante en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducida por tunicamicina*

A pesar de que las proteínas parálogas Ssk2p y Ssk22p se han reportado previamente como redundantes para responder al estrés osmótico (Posas & Saito, 1998; Tatebayashi et al., 2003), en este trabajo describimos que su función no es redundante en el sistema de respuesta a tunicamicina.

Aunque la identidad de SSK2 y SSK22 no es muy alta como en el caso de otros genes parálogos, como por ejemplo, RPL32-1 y RPL32-2 (Proteínas ribosomales), que tienen una identidad del 96% (Sun et al., 2013), se ha mantenido la propuesta de que son redundantes. Bien podría decirse que aunque el evento de duplicación en el que surgieron SSK2 y SSK22 disminuyó la presión selectiva en ambos genes, no dio lugar a la subfuncionalización, debido a que los dominios que contiene cada proteína no le permiten actuar en otra vía de respuesta a estrés, como sucede en diversos procesos evolutivos que actúan sobre pares de genes parálogos (Grassi et al., 2010). No obstante, nuestros datos sugieren que su variación en la secuencia de aminoácidos, sobre todo en el dominio amino de ambas proteínas (Figura 3), es suficiente para permitir la especialización de Ssk2p para actuar en respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.

En nuestro trabajo observamos distintos fenotipos. Una mutante  $\Delta ssk2$  es sensible a la tunicamicina, mientras que la mutante  $\Delta ssk22$  es prácticamente idéntica a la cepa silvestre, y una mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22$  es muy sensible (Figuras 6 y 9). Dicho fenómeno podría deberse a que en la mutante  $\Delta ssk22$  el crecimiento observado se debe a la presencia de SSK2 que se ha observado que está más involucrada en la respuesta a tunicamicina, por otro lado, en una mutante  $\Delta ssk2$ , la presencia de SSK22 no es suficiente para contender con la presencia de la tunicamicina; y por lo tanto, en la mutante

$\Delta ssk2\Delta ssk22$  se observa un mayor grado de sensibilidad al estar ausentes ambas proteínas.

Esto indica que el papel que juegan estas dos proteínas en la vía es diferente, e incluso podrían actuar de forma no lineal o ser parte de vías distintas. Lo anterior sugiere fuertemente que Ssk2p y Ssk22p no son redundantes en la respuesta a la tunicamicina.

Esta observación se apoya en el hecho de que Ssk2p y Ssk22p presentan diferentes actividades en la respuesta al estrés osmótico, como reportaron Maeda et al. (1995). En ese reporte se determinó que Ssk22p transmite la señal de Ssk1p hacia Pbs2p más débilmente que Ssk2p; además se reportó que la interacción de Ssk1p con Ssk2p requiere del dominio amino de Ssk2p, sugiriendo la importancia de esta región.

Para determinar con mayor precisión las diferencias de crecimiento de las mutantes en tunicamicina, decidimos hacer experimentos de complementación expresando tanto en las mutantes sencillas, como en la doble mutante a los genes *SSK2* y *SSK22* bajo el control del promotor de galactosa, mediante el uso del plásmido pYES2 (*Figuras 9 y 8*). Este ensayo nos permitió generar dosis equivalentes de cada proteína y determinar sus efectos en el crecimiento de las diferentes mutantes. Con estos experimentos encontramos que mientras Ssk2p revierte la sensibilidad de la mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta sho1$ , Ssk22p es incapaz de hacerlo (*Figura 9*). Con este resultado confirmamos que Ssk2p juega un papel más importante en el sistema de respuesta a tunicamicina que el de Ssk22p.

### *La respuesta a tunicamicina inducida por Ssk2p y Ssk22p es independiente de la UPR*

La respuesta clásica a estrés de retículo endoplásmico, denominada Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) ha sido ampliamente descrita en la literatura (Mori et al., 1996; Okamura et al., 2000; Ron & Walter, 2007; Zhang & Kaufman, 2004a). Dicha respuesta se considera la principal para contender con agentes inductores de estrés en el retículo, ya sean drogas o expresión de proteínas que la célula es incapaz de plegar adecuadamente.



Si bien la UPR es fundamental para responder al estrés de retículo endoplásmico, se han descrito mutantes que a pesar de tener una UPR completamente normal, son incapaces de contender con la presencia de inductores de estrés de retículo endoplásmico (Bicknel et al., 2010; Torres-Quiroz et al., 2010). En este trabajo describimos que las mutantes nulas de *SSK2* y *SSK22* son sensibles a tunicamicina, a pesar de que pueden inducir la UPR a un nivel idéntico a las células silvestres (*Figura 7*); lo que podría sugerir que el efecto observado no se debe a una alteración en la regulación de la UPR.

A pesar de que no observamos defectos en la UPR en la doble mutante  $\Delta ssk2\Delta ssk22$ , no descartamos que estas proteínas, y principalmente *Ssk2p*, pueda tener una relación con la UPR, ya que se ha visto que un choque hipotónico es capaz de alterar la estabilidad de *Hac1p*, el activador transcripcional de genes de la UPR (Pal et al., 2007).

### *Las interacciones de Ssk2p y Ssk22p en respuesta a tunicamicina son distintas*

La sensibilidad del ensayo de PCA en mamífero es muy alta, y es capaz de detectar interacciones de proteínas cuya expresión es muy baja (Remy et al., 2007), además de cambios sutiles en la expresión de pares de proteínas (Freschi et al., 2013). Recientemente se publicó que la técnica también es capaz de detectar cambios en las interacciones de diversas proteínas en respuesta a condiciones distintas en el medio, al menos en respuesta al daño en el DNA (Rochette et al., 2014). Nuestros resultados confirman que el ensayo de PCA sí puede detectar cambios en las interacciones proteína-proteína en distintas condiciones en el medio, en presencia de inductores de estrés osmótico (Sorbitol) y estrés de retículo endoplásmico (Tunicamicina), a pesar de que estas interacciones suelen ser transitorias o no muy estables, ya que las respuestas no deben ser sostenidas, pues se puede provocar *cross-talk* o letalidad en algunos casos.

De manera más relevante para nuestro trabajo, pudimos detectar diferencias en las interacciones proteína-proteína de *Ssk2p* y *Ssk22p* en respuesta a la tunicamicina; de esta manera confirmamos que existen, además de las diferencias fenotípicas, diferencias en sus interacciones, lo que sugiere aún más que estas proteínas parálogas no son

redundantes (*Figuras 10 b, c y d*). Nuestro estudio también nos permite ver que las interacciones de Ssk2p y Ssk22p tienen diferente intensidad.

Finalmente, nos permitió seleccionar algunos interactuantes de Ssk2p y Ssk22p y comprobar que algunas mutantes nulas de esas proteínas son sensibles a tunicamicina.

### *Existen otras proteínas involucradas en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducida por tunicamicina*

Hasta la realización de este trabajo, sólo habíamos descrito la sensibilidad a la tunicamicina de las mutantes nulas de la vía HOG. Gracias a nuestro ensayo de PCA describimos dos nuevas mutantes nulas para proteínas que no han sido descritas como parte de esa vía (Con excepción de Ubp3p) pero que interactúan al menos con Ssk2p para responder al estrés de retículo endoplásmico.

Una de las proteínas que encontramos, Ubp3p (Ubiquitin proteasa), está involucrada en la activación transcripcional de los genes blanco de Hog1p en respuesta al estrés osmótico (Solé et al., 2011). Esto sugiere que además podría actuar en conjunto con Hog1p para responder a la tunicamicina.

Por otro lado, encontramos a Rrd1p, que tiene actividad de peptidil prolil cis/trans isomerasa y está involucrada en la regulación de la fosfatasa 2A. Anteriormente se describió que una doble mutante del gen *RRD1* y su parólogo *RRD2* es inviable, y esta falla en el crecimiento es suprimida mediante la inactivación de Hog1p o Pbs2p (Rempola et al., 2000). Aunque no se determinó si hay una interacción de las proteínas Rrd1p y Hog1p o Pbs2p, se describió una posible regulación de Rrd1p en la vía HOG. Nuestro resultado sugiere que la relación entre Rrd1p y la vía HOG está en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico y esa relación puede ser a nivel de Ssk2p.

Los resultados que obtuvimos en el presente trabajo confirman que Ssk2p y Ssk22p no son redundantes en la respuesta a la tunicamicina, y describimos que este par de proteínas parálogas tienen un comportamiento distinto al observado en la vía HOG. Este fenómeno debe tener como base la diferencia en las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas, principalmente en la región amino de Ssk2p que al ser más grande y por

ello mismo diferente, podría permitir su asociación con proteínas distintas a las que se asocia Ssk22p (*Figura 4*).

También parece ser que Ssk2p tiene más funciones para la célula que Ssk22p, ya que Ssk22p tiene un nivel de expresión menor, y su eliminación tiene efectos marginales en diferentes condiciones de estrés (*Figuras 6 y 9*).

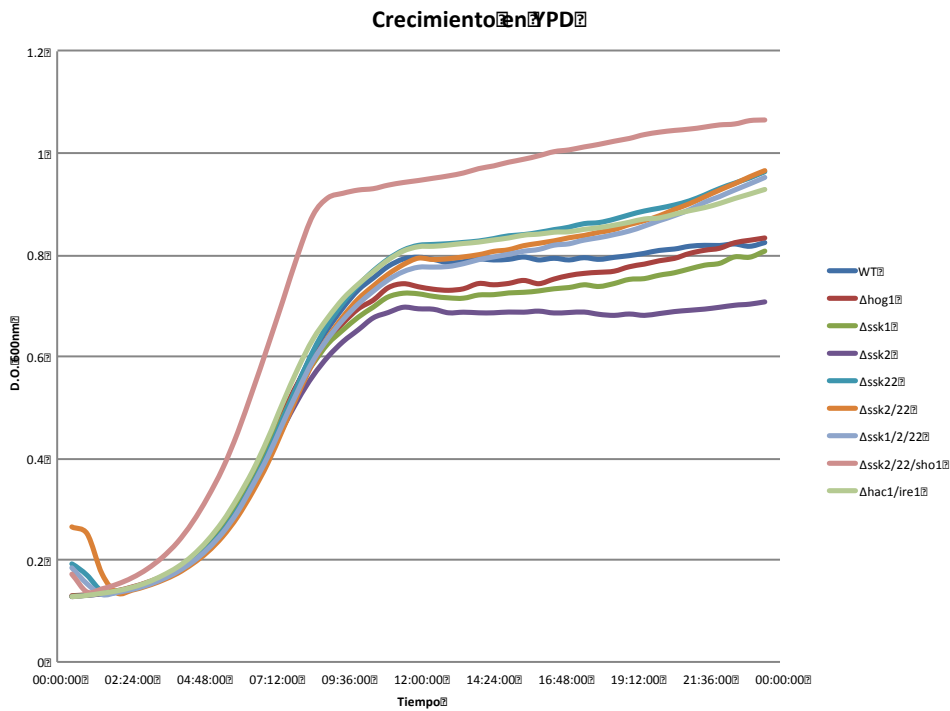
## CONCLUSIONES

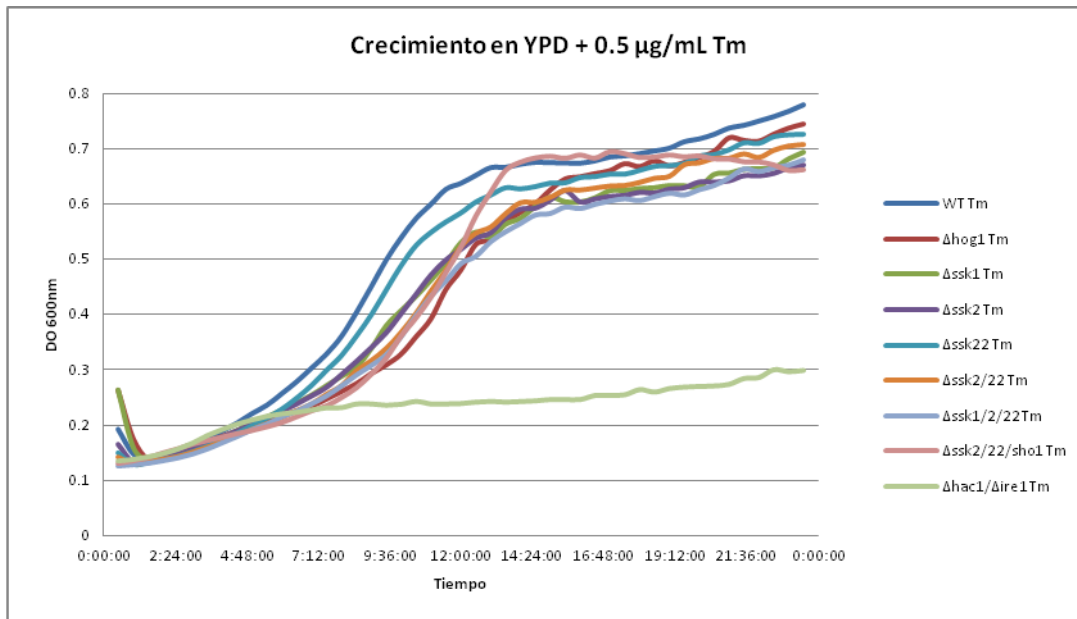
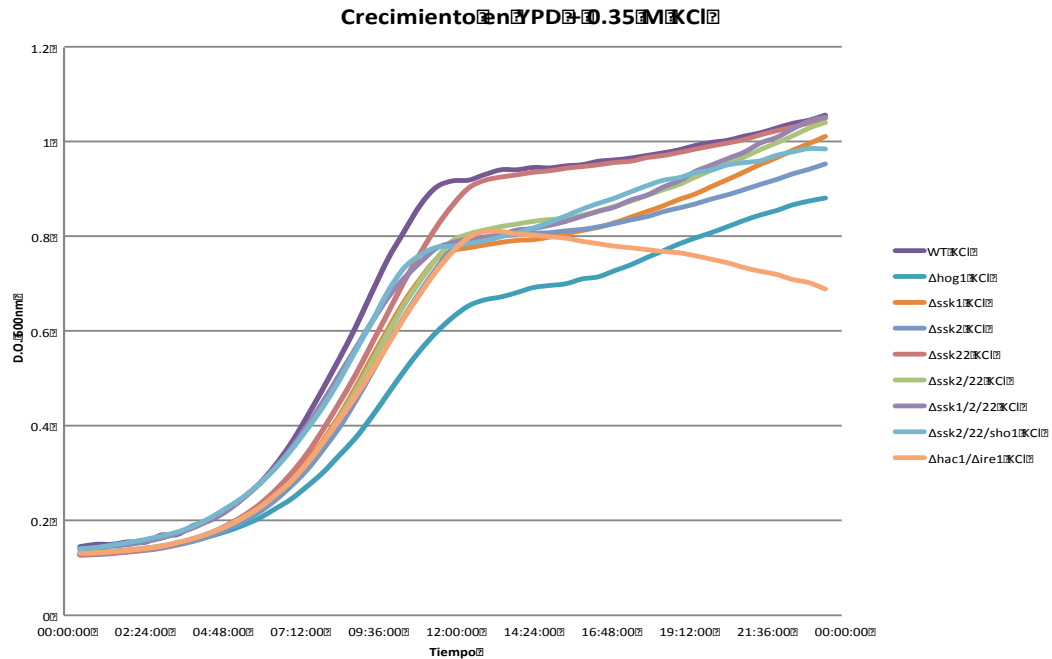
- La función de las proteínas parálogas Ssk2p y Ssk22p no es redundante ante el estrés de retículo endoplásmico inducido por la tunicamicina.
- Ssk2p es indispensable para responder al estrés de retículo endoplásmico y Ssk22p no es capaz de suplirla.
- Las interacciones proteína-proteína de Ssk2p y Ssk22p son distintas en presencia de tunicamicina.
- Ubp3p y Rrd1p son interactores de Ssk2p y están involucradas en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.

# APÉNDICE

## 1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS UTILIZADAS EN ENSAYOS DE DILUCIONES SERIADAS

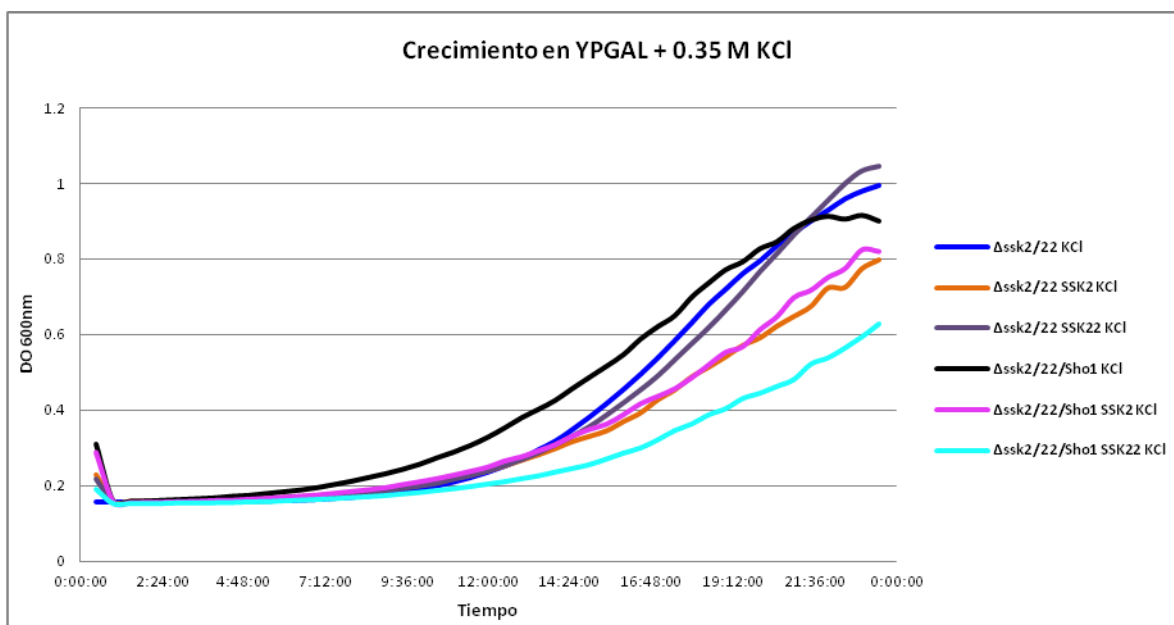
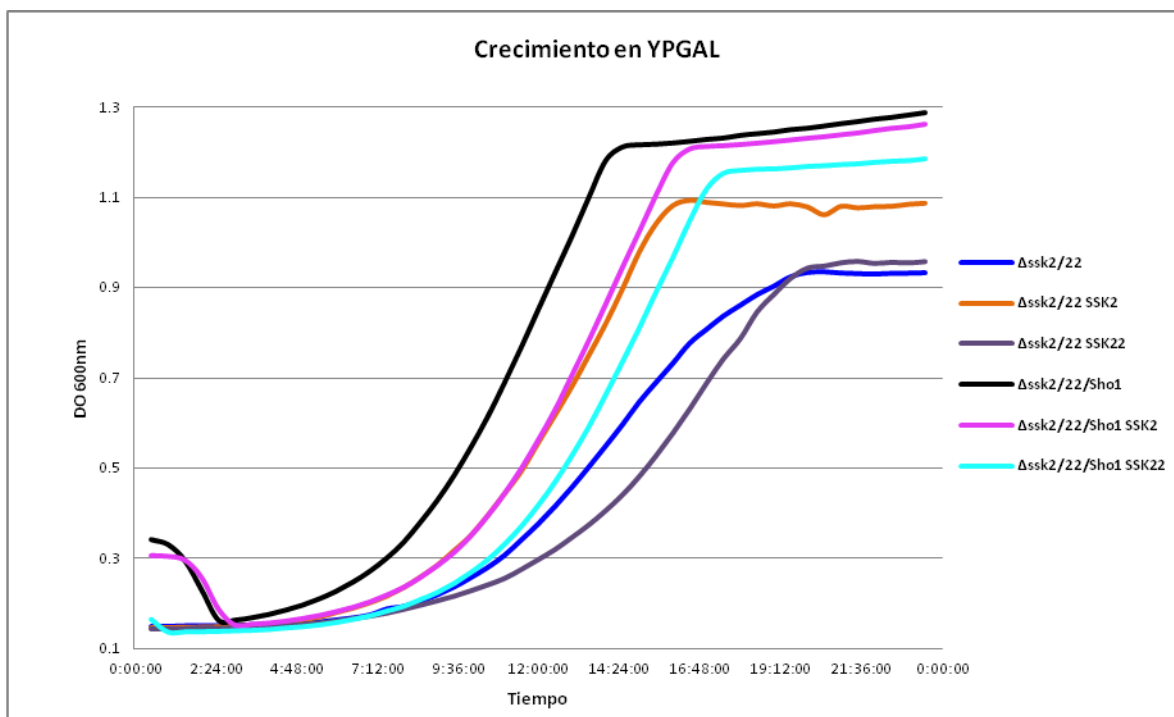
A continuación se presentan gráficas de las curvas de crecimiento de las diversas cepas utilizadas en este trabajo. Se muestran como ensayos cuantitativos que utilizamos para apoyar los resultados de nuestros ensayos de diluciones seriadas. Los datos mostrados son los promedios de los triplicados realizados en cada experimento.

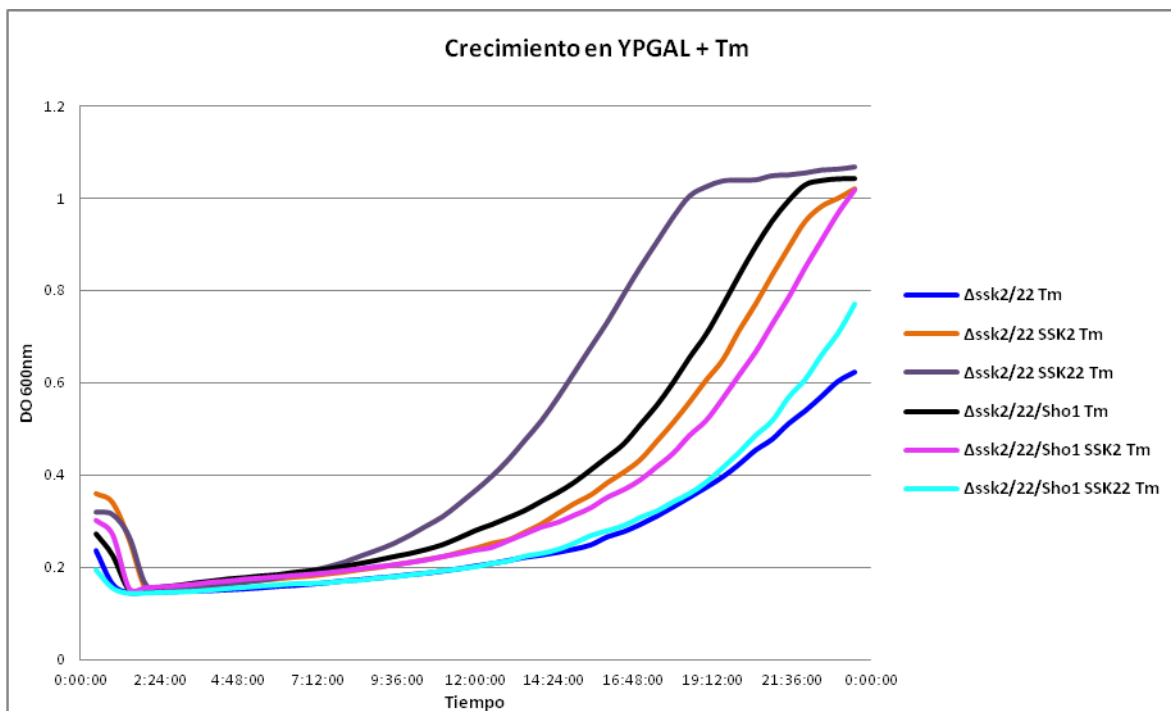




**Figura S1. Curvas de crecimiento de las mutantes nulas del fondo genético BY.** Las células se cultivaron en medio YPD adicionado con cloruro de potasio (KCl) 0.35 M o 0.5  $\mu$ g/mL de tunicamicina (Tm). Los cultivos se ajustaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 y se incubaron durante 24 horas a 30° C con agitación constante y se leyó la absorción de la luz de cada cultivo cada 30 minutos.

Curvas de crecimiento de las cepas  $\Delta ssk2/ssk22$  y  $\Delta ssk2/ssk22/sho1$ , transformadas con Ssk2 y Ssk22 silvestres. Se realizaron los ensayos en presencia de cloruro de potasio o de tunicamicina para observar sus distintos grados de sensibilidad a estrés osmótico y de retículo endoplásmico, respectivamente.



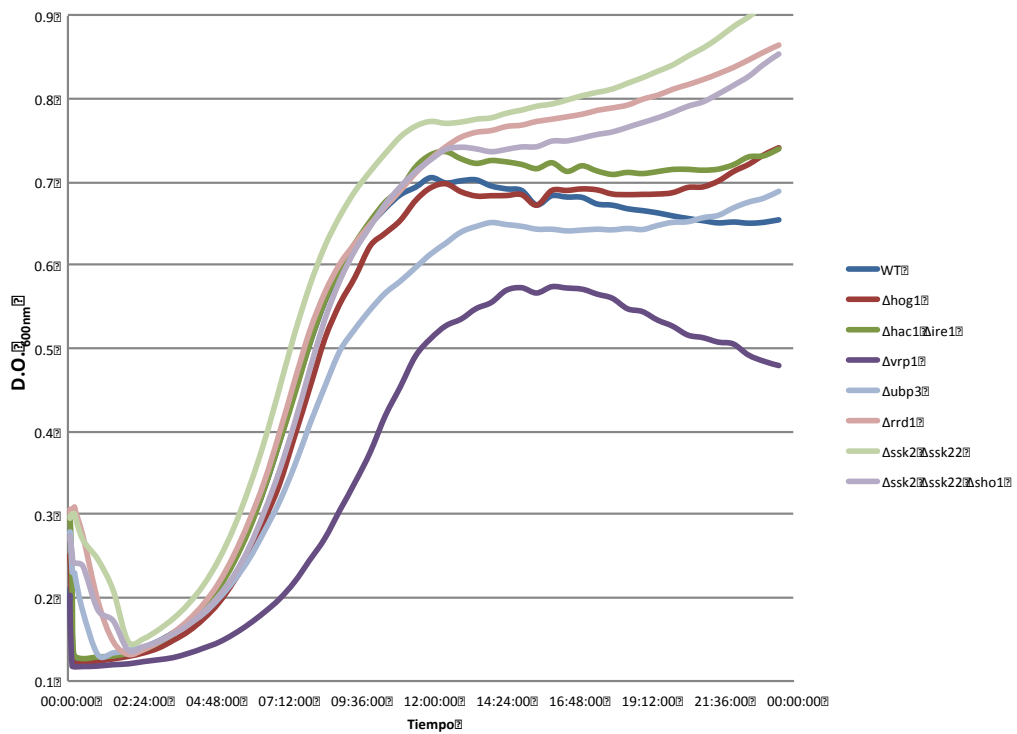


**Figura S2. Curvas de crecimiento de las mutantes nulas  $\Delta$ ssk2/ $\Delta$ ssk22 y  $\Delta$ ssk2/ssk22/sho1 del fondo genético BY.** Las células se transformaron con SSK2 silvestre (“SSK2”), o SSK22 silvestre (“SSK22”). Las células se cultivaron en medio YPGAL adicionado con cloruro de potasio (KCl) 0.35 M o 0.5  $\mu$ g/mL de tunicamicina (Tm). Los cultivos se ajustaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 y se incubaron durante 24 horas a 30° C con agitación constante y se leyó la absorción de la luz de cada cultivo cada 30 minutos. En este ensayo se utilizó YPGAL debido a que las construcciones están dentro del plásmido de expresión pYES2 que es inducible por galactosa.

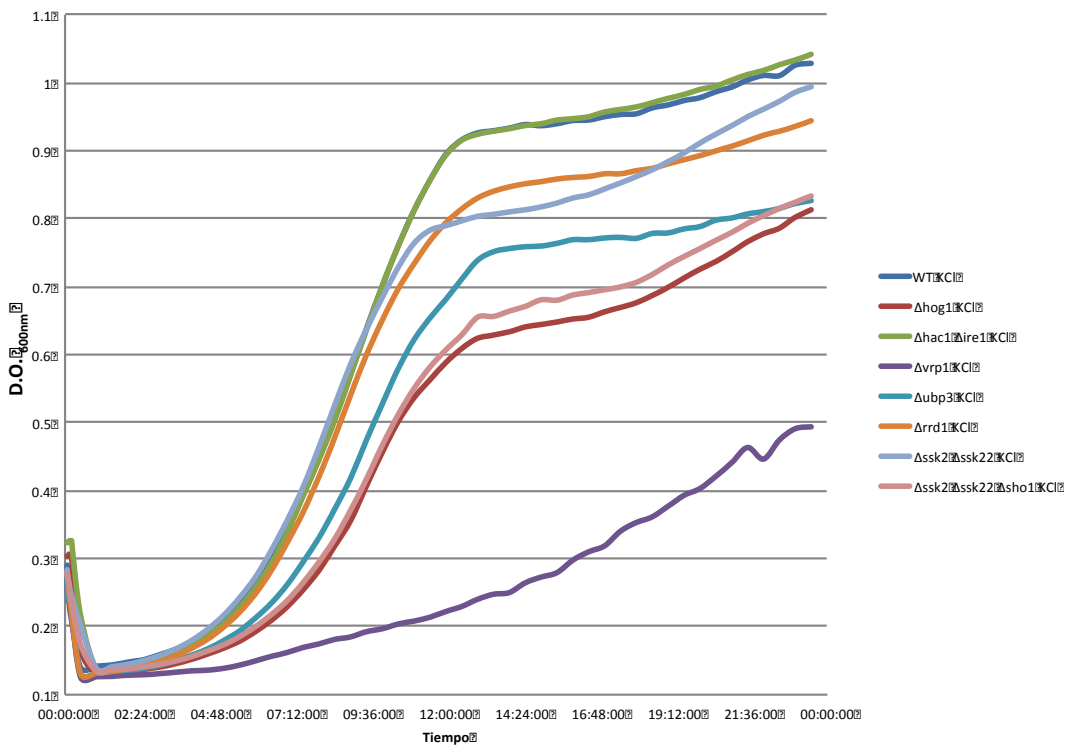
Curvas de crecimiento de las cepas silvestre,  $\Delta$ hog1,  $\Delta$ hac1 $\Delta$ ire1,  $\Delta$ vrp1,  $\Delta$ ubp3,  $\Delta$ rrd1,  $\Delta$ ssk2 $\Delta$ ssk22 y  $\Delta$ ssk2 $\Delta$ ssk22 $\Delta$ sho1 del fondo genético BY. Se realizaron los ensayos en presencia de cloruro de potasio o de tunicamicina para observar sus distintos grados de sensibilidad a estrés osmótico y de retículo endoplásmico, respectivamente. Las cepas  $\Delta$ vrp1,  $\Delta$ ubp3 y  $\Delta$ rrd1, se seleccionaron a partir del ensayo de PCA hecho con Ssk2p y Ssk22p. En el caso de este ensayo se utilizan las cepas, silvestre (“WT”),  $\Delta$ hog1,  $\Delta$ ssk2 $\Delta$ ssk22,  $\Delta$ ssk2 $\Delta$ ssk22 $\Delta$ sho1 y  $\Delta$ hac1 $\Delta$ ire1, con fines de comparación, ya que presentan fenotipos que conocemos de ensayos previos.

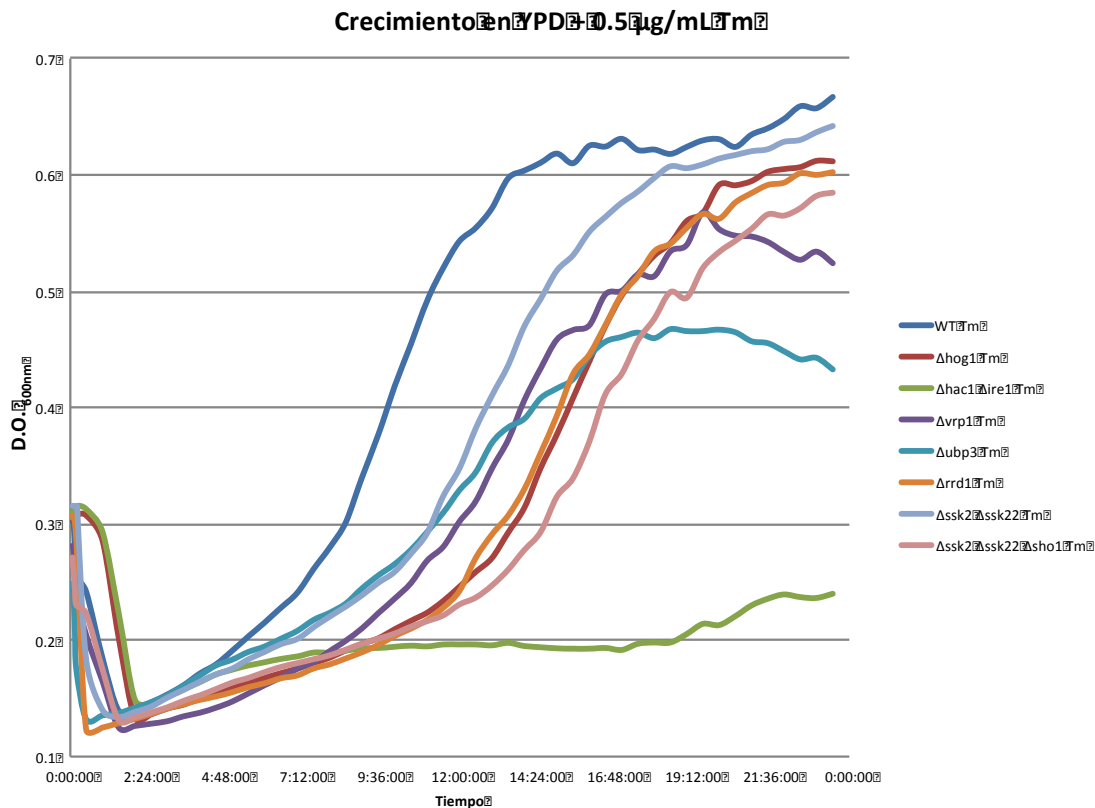


### Crecimiento en YPD



### Crecimiento en YPD + 0.35M KCl

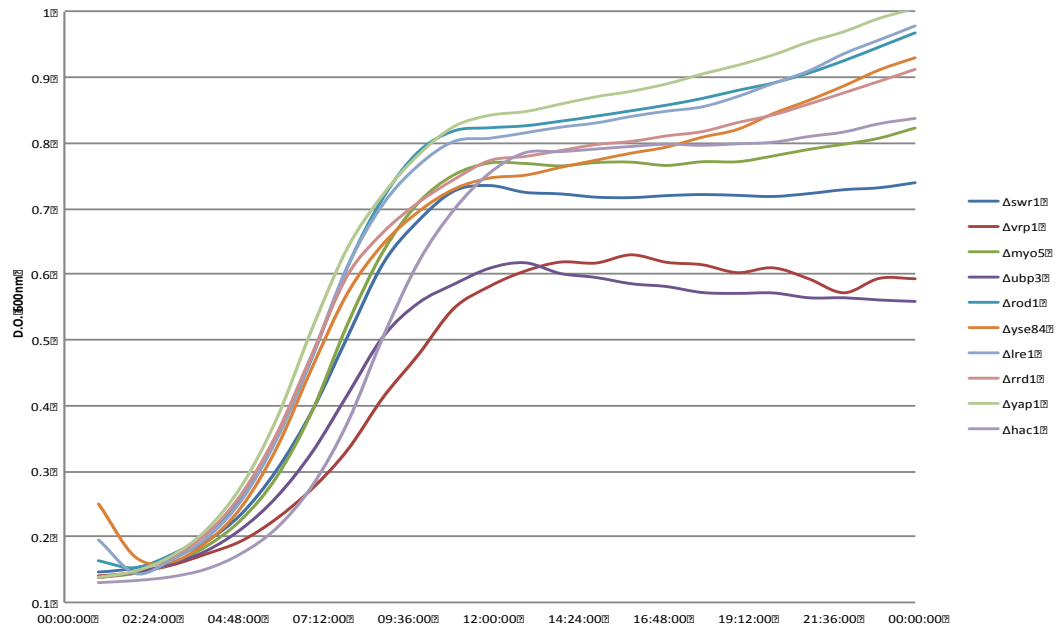




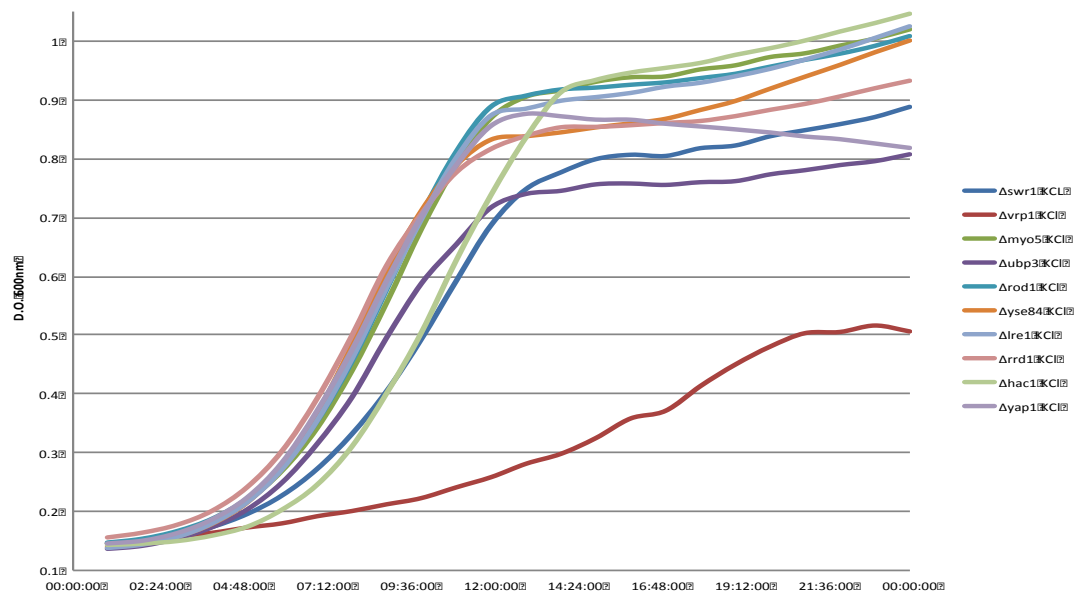
**Figura S3. Curvas de crecimiento de diversas mutantes nulas del fondo genético BY.** Las células se cultivaron en medio YPD adicionado con cloruro de potasio (KCl) 0.35 M o 0.5  $\mu$ g/mL de tunicamicina (Tm). Los cultivos se ajustaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 y se incubaron durante 24 horas a 30° C con agitación constante y se leyó la absorción de luz de cada cultivo cada 30 minutos.

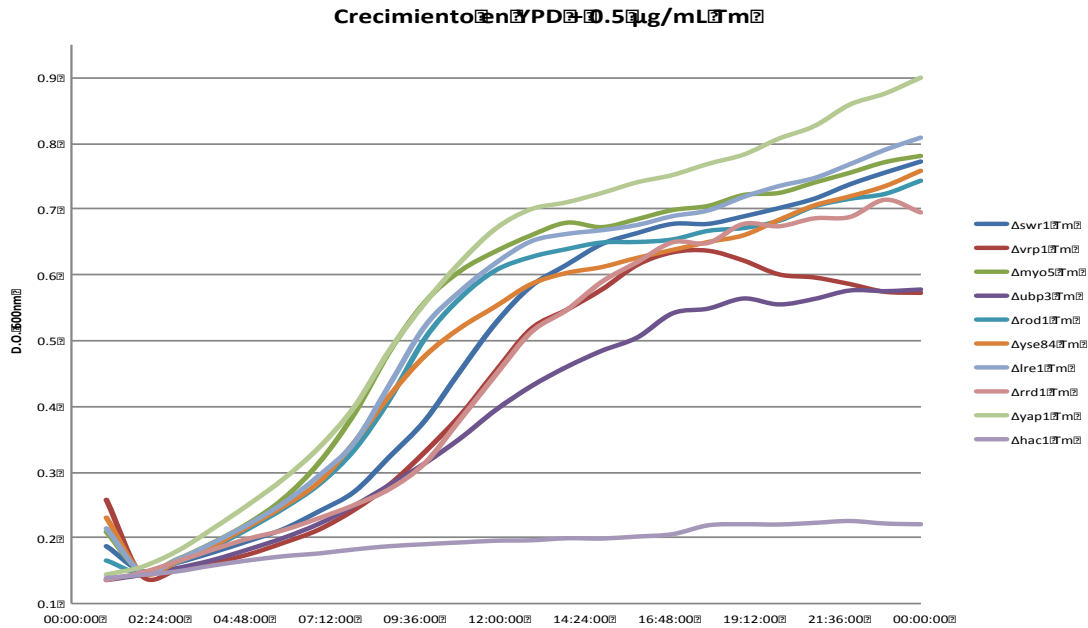
Curvas de crecimiento de las cepas  $\Delta$ swr1,  $\Delta$ vpr1,  $\Delta$ myo5,  $\Delta$ ubp3,  $\Delta$ rod1,  $\Delta$ lre1,  $\Delta$ rrd1,  $\Delta$ yap1 y  $\Delta$ hac1 del fondo genético BY. Se realizaron los ensayos en presencia de cloruro de potasio o de tunicamicina para observar sus distintos grados de sensibilidad a estrés osmótico y de retículo endoplásmico, respectivamente. Todas las cepas, excepto la  $\Delta$ hac1 fueron seleccionadas a partir del ensayo de PCA hecho con Ssk2p y Ssk22p.

Crecimiento en YPD



Crecimiento en YPD + 0.35M KCl





**Figura S4. Curvas de crecimiento de diversas mutantes nulas del fondo genético BY.** Las células se cultivaron en medio YPD adicionado con cloruro de potasio (KCl) 0.35 M o 0.5 µg/mL de tunicamicina (Tm). Los cultivos se ajustaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 y se incubaron durante 24 horas a 30° C con agitación constante y se leyó la absorción de luz de cada cultivo cada 30 minutos.

## 2. SCRIPT UTILIZADO PARA GENERAR HEATMAPS

```
> library("ggplot2")
> library("plyr")
> library("RColorBrewer")
> library("reshape2")
> library("scales")
> ssk22 <- read.csv("~/nombre del archivo.csv")
> ssk22 <- ssk22[,1:4]
> ssk22 <- ssk22[order(ssk22$TM75),]
> ssk22$PROTEIN <- with(ssk22, reorder(PROTEIN, TM75))
> ssk22.m <- melt(ssk22)
Using PROTEIN as id variables
> cols <- rev(brewer.pal(11, 'RdYlBu'))
> ssk22.m <- ddply(ssk22.m, .(variable), transform, rescale =
rescale(value))
```

```
> (p <- ggplot(ssk22.m, aes(variable, PROTEIN)) + geom_tile(aes(fill =
rescale), colour = "black")
+ + scale_fill_gradient2("Interaccion con Ssk22", low =
muted("#053061"), mid = "#f7f7f7", high = muted("#67001f"), midpoint =
0.5))
> p + theme_grey(base_size = 6) + labs(x = "Condiciones", y = "ORFs") +
scale_x_discrete(expand = c(0, 0)) +
+ scale_y_discrete(expand = c(0, -3)) +
+ theme(legend.position = "right", axis.ticks = element_blank(),
axis.text.x = element_text(size = 6, angle = 0, hjust = 0, colour =
"black"))
```

## REFERENCIAS

- Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., & Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *The EMBO Journal*, *22*(10), 2433–42. doi:10.1093/emboj/cdg243
- Amberg, D. C., Burke, D., & Strathern, J. N. (2005). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=47zspjkkCwC&pgis=1>
- Arnold, E., & Tanner, W. (1982). An obligatory role of protein glycosylation in the life cycle of yeast cells. *FEBS Letters*, *148*(1), 49–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6184248>
- Barnes, G., Hansen, W. J., Holcomb, C. L., & Rine, J. (1984). Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic analysis of an early step. *Molecular and Cellular Biology*, *4*(11), 2381–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=369068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bicknell, A. a, Tourtellotte, J., & Niwa, M. (2010). Late phase of endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17545–17555. doi:10.1074/jbc.M109.084681
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., ... Boone, C. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5964), 425–31. doi:10.1126/science.1180823
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., & Silver, P. a. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal*, *17*(19), 5606–14. doi:10.1093/emboj/17.19.5606
- Freschi, L., Torres-Quiroz, F., Dubé, A. K., & Landry, C. R. (2013). qPCA: a scalable assay to measure the perturbation of protein-protein interactions in living cells. *Molecular bioSystems*, *9*(1), 36–43. doi:10.1039/c2mb25265a
- Grassi, L., Fusco, D., Sellerio, A., Corà, D., Bassetti, B., Caselle, M., & Lagomarsino, M. C. (2010). Identity and divergence of protein domain architectures after the yeast whole-genome duplication event. *Molecular bioSystems*, *6*(11), 2305–15. doi:10.1039/c003507f
- Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R. W., & Li, W.-H. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*, *421*(6918), 63–6. doi:10.1038/nature01198
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., ... Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, *415*(6868), 180–3. doi:10.1038/415180a
- Hughes, A. L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *256*(1346), 119–24. doi:10.1098/rspb.1994.0058
- ImageJ. (n.d.). Retrieved April 25, 2014, from <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, *96*(1), 23–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2265755>
- Ito, T., Takatsuki, A., Kawamura, K., Sato, K., & Tamura, G. (1980). Isolation and Structures of Components of Tunicamycin. *Agricultural and Biological Chemistry*, *44*(3), 695–698.
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *428*(6983), 617–24. doi:10.1038/nature02424
- Klipp, E., & Liebermeister, W. (2006). Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neuroscience*, *7* Suppl 1, S10. doi:10.1186/1471-2202-7-S1-S10
- Krakauer, D. C., & Nowak, M. a. (1999). Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *10*(5), 555–9. doi:10.1006/scdb.1999.0337
- Li, J., Yuan, Z., & Zhang, Z. (2010). The cellular robustness by genetic redundancy in budding yeast. *PLoS Genetics*, *6*(11), e1001187. doi:10.1371/journal.pgen.1001187
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., ... Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5852), 944–9. doi:10.1126/science.1146361
- Maeda, T., Takekawa, M., & Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5223), 554–8.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, *369*(6477), 242–5. Retrieved from <http://proquest.umi.com/pqdweb?did=4952261&sid=2&Fmt=6&clientId=39522&RQT=309&VName=PQD>
- Mattison, C. P., & Ota, I. M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes & Dev.*, *14*(10), 1229–1235. doi:10.1101/gad.14.10.1229
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (p. 466). Cold Spring Harbor Laboratory. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=PtVpAAAAMAAJ&pgis=1>

- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., & Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1(9), 803–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077435>
- Murakami, Y., Tatebayashi, K., & Saito, H. (2008). Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), 2481–94. doi:10.1128/MCB.01817-07
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, a, & Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 445–50. doi:10.1006/bbrc.2000.3987
- Pal, B., Chan, N. C., Helfenbaum, L., Tan, K., Tansey, W. P., & Gething, M.-J. (2007). SCFCdc4-mediated degradation of the Hac1p transcription factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(2), 426–40. doi:10.1091/mbc.E06-04-0304
- Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X., & Michnick, S. W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12141–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Posas, F., & Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO Journal*, 17(5), 1385–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482735>
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell*, 86(6), 865–75.
- Reiser, V., Raitt, D. C., & Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1035–40. doi:10.1083/jcb.200301099
- Reiser, V., Ruis, H., & Ammerer, G. (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4), 1147–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rempola, B., Kaniak, A., Migdalski, A., Rytka, J., Slonimski, P. P., & di Rago, J. P. (2000). Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics : MGG*, 262(6), 1081–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660069>
- Remy, I., Campbell-Valois, F. X., & Michnick, S. W. (2007). Detection of protein-protein interactions using a simple survival protein-fragment complementation assay based on the enzyme dihydrofolate reductase. *Nature Protocols*, 2(9), 2120–5. doi:10.1038/nprot.2007.266
- Rep, M. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. Hot1p AND Msn2p/Msn4p ARE REQUIRED FOR THE INDUCTION OF SUBSETS OF HIGH OSMOLARITY GLYCEROL PATHWAY-DEPENDENT GENES. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290–8300. doi:10.1074/jbc.275.12.8290
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G., & Ruis, H. (1999). Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Mol. Cell Biol.*, 19(8), 5474–5485. Retrieved from <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/19/8/5474>
- Rochette, S., Gagnon-Arsenault, I., Diss, G., & Landry, C. R. (2014). Modulation of the yeast protein interactome in response to DNA damage. *Journal of Proteomics*, 100, 25–36. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.007
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–29. doi:10.1038/nrm2199
- SGD Project. (n.d.). Retrieved from <http://www.yeastgenome.org/>
- Shamu, C. E., Cox, J. S., & Walter, P. (1994). The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends in Cell Biology*, 4(2), 56–60. Retrieved from [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TCX-47G9PKV-1T&\\_user=945819&\\_coverDate=02/28/1994&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=gateway&\\_origin=gateway&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_rerunOrigin=scholar.google&\\_acct=C000048981&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=945819&md5=b7426b49f317a526c975f142b5644bca&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCX-47G9PKV-1T&_user=945819&_coverDate=02/28/1994&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000048981&_version=1&_urlVersion=0&_userid=945819&md5=b7426b49f317a526c975f142b5644bca&searchtype=a)
- Solé, C., Nadal-Ribelles, M., Kraft, C., Peter, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2011). Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmotic stress. *The EMBO Journal*, 30(16), 3274–84. doi:10.1038/emboj.2011.227
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S. W., & Brisson, N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature Biotechnology*, 19(8), 769–72. doi:10.1038/90831

- Sun, L., Yang, X., Chen, F., Li, R., Li, X., Liu, Z., ... Yuan, S. (2013). Paralogous ribosomal protein I32-1 and I32-2 in fission yeast may function distinctively in cellular proliferation and quiescence by changing the ratio of rpl32 paralogs. *PLoS One*, 8(4), e60689. doi:10.1371/journal.pone.0060689
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C. R., Radinovic, S., Serna Molina, M. M., Shames, I., ... Michnick, S. W. (2008a). An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1465–70. doi:10.1126/science.1153878
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C. R., Radinovic, S., Serna Molina, M. M., Shames, I., ... Michnick, S. W. (2008b). An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1465–70. doi:10.1126/science.1153878
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., & Saito, H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *The EMBO Journal*, 22(14), 3624–34. doi:10.1093/emboj/cdg353
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., ... Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO Journal*, 26(15), 3521–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627274>
- The R Project for Statistical Computing. (n.d.).
- Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2010). The activity of the yeast HOG1 MAP kinase is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *The Journal of Biological Chemistry*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430884>
- Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., & Ota, I. (2001). Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 51–60. doi:10.1128/MCB.21.1.51-60.2001
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2004a). Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmic Reticulum \*, 6(19), 1–4. doi:10.1074/jbc.R400008200
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2004b). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25935–8. doi:10.1074/jbc.R400008200

TL;DR.