



Facultad de Medicina



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Papel de los reguladores de respuesta del sistema de fosforrelevo de levaduras en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en Investigación Biomédica Básica presenta el alumno Abiram Eliab Olivares Resendiz

Tutor

Dr. Roberto Coria Ortega

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017.



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.

Índice

Agradecimientos.....	3-4
Introducción.....	5-17
1. Estrés de retículo endoplásmico en levaduras	5-8
1.1 Estrés de retículo endoplásmico.....	5
1.2 La UPR de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6-7
1.3 Inductores de estrés de retículo endoplásmico.....	7-8
1.4 Vía de Alta-Osmolaridad-Glicerol en estrés de retículo endoplásmico.....	8-10
2. Sistemas de fosforrelevo	9-14
2.1 Señalización por fosforrelevo.....	10-11
2.2 El sistema de fosforrelevo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11-12
2.3 Sln1p.....	12
2.4 Ypd1p.....	12
2.5 Ssk1p y Skn7p.....	13-15
3. Crz1p y la respuesta dependiente de calcio	15-17
3.1 Señalización mediada por calcio.....	15
3.2 Crz1p.....	15-16
3.3 Crz1p y Skn7p.....	16-17
Planteamiento del problema y justificación, hipótesis, y objetivo general.....	18
Resultados.....	19-29
• Skn7p participa en la respuesta a ERE	19-20
• Participación de los reguladores de respuesta del sistema de fosforrelevo en la respuesta a ERE	20-21
• Participación del fosforrelevo en ERE	21-23
• Papel de los factores de transcripción activados por estrés oxidante en condiciones de ERE	23-25
• Interacción genética entre Crz1p y Skn7p	26-27
• Participación de Calcineurina en la respuesta a ERE	27-28
• Localización de Crz1p durante el ERE	28-29
Discusión.....	30-35
Conclusiones.....	36
Materiales y métodos.....	37-44
Referencias.....	45-51
Anexo I (abreviaturas)	52-53
Anexo II (gráficas de citometría)	54-55

Agradecimientos

Al Dr. Roberto Coria Ortega por dirigir este proyecto y asesorarme en la escritura de la presente tesis.

A la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, la Dra. Rosa Navarro, la Dra. Eda Patricia Tenorio y al Dr. Francisco Torres Quiroz, por sus pertinentes comentarios y revisión del presente documento.

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por su incontable apoyo técnico y formativo durante mi estancia en el laboratorio.

A Maricela ... por su inigualable e invaluable desempeño como técnico laboratorista, así como por su apoyo incondicional (en todos los aspectos posibles) a los miembros del laboratorio.

A la M. en C Eunice A. Domínguez Martín por ser la mejor Tutorcilla, compañera y amiga que pude tener.

A los estudiantes del laboratorio con quienes conviví durante mi estancia, y que hicieron de mi existencia la cosa más divertida y relajada del mundo.

A la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C Minerva Mora y la Biol. Guadalupe Códiz, miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por su asesoría técnica y excelentes servicios.

Al Biol. Gerardo Coello, la M. en C. Ana María Escalante y al ... Juan Barbosa, miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Al personal de las bibliotecas del Instituto de Fisiología Celular y del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Lic. Cynthia Lima y Mayra Ocegüera por su colosal esfuerzo por mantener funcionando de manera eficiente a la LIBB (y a sus estudiantes).

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su inagotable compromiso con la formación académica de los estudiantes de la LIBB, por sus excelentes clases y muy acertados comentarios y por impulsar mi desarrollo académico al permitirme colaborar como asistente en su materia con total libertad creativa e intelectual.

A mis alumnitos de la materia de Biología Celular I y II, por construirme en mi labor de enseñanza, por aguantar mis exigencias y superar los estándares que procuré inculcarles, y por hacer la clase sumamente divertida.

A la mayoría de mis compañeros de generación (lo que es), por hacer de mi tiempo en la LIBB afable y por sentar un estándar académico alto que siempre me obligó a exigirme más y más intelectualmente.

A Gisselle, Erick y Fátima, porque aunque el tetrámero se haya disociado, su recuerdo estará profunda e indeleblemente grabado en mi alma por el resto de mis días.

A los organismos financiadores de este proyecto: CONACyT (CB254078) y PAPIIT, DGAPA, UNAM (IN210616).

Introducción

1. Estrés de retículo endoplásmico en levaduras.

1.1 Estrés de retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento membranoso dentro del cual ocurre aproximadamente un tercio de la síntesis total de proteínas en las células eucariotas^{1,2}. Este organelo es además, el principal sitio de almacenaje de calcio en las células de mamífero y el segundo más importante en las células de levadura (siendo el principal la vacuola)³⁻⁵. Debido a la importancia de estas dos funciones, mantener la homeostasis del RE es vital para la supervivencia de las células eucariotas.

La homeostasis del RE requiere un balance entre la carga de síntesis proteica y un adecuado control de la movilidad del calcio entre el organelo y el citoplasma^{2,5,6}. Cuando la homeostasis del retículo endoplásmico se pierde, ocurre un evento que se denomina Estrés de Retículo Endoplásmico (ERE). El tipo de estrés de retículo endoplásmico más estudiado es el que ocurre debido a una sobrecarga de la capacidad de síntesis proteica del organelo. Al suscitarse dicho estrés, se desencadenan distintos eventos de señalización celular destinados a reestablecer la homeostasis del RE. La vía de señalización más importante para contender con el ERE es la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR, por sus siglas en inglés)^{2,7}.

La UPR está conservada en todos los organismos eucariontes estudiados a la fecha. En levaduras la vía está conformada por una sola rama: la vía de Ire1p; en mamíferos la UPR ha adquirido un grado de complejidad mayor, siendo dirigida por tres vertientes cuyas funciones son parcialmente redundantes⁷.

El adecuado funcionamiento de la UPR es esencial para la supervivencia en eucariontes. Se han encontrado afecciones en la UPR en distintas enfermedades, como Huntington, Parkinson y Alzheimer^{8,9}. De igual manera plantas como *Arabidopsis thaliana* así como varias especies de levaduras y hongos muestran afecciones en el crecimiento y la viabilidad al ser tratados con inductores de ERE.

Los principales componentes de la UPR tanto en mamíferos, como en plantas y hongos han sido descritos a lo largo de los años. Sin embargo, también se han identificado varias proteínas cuya función afecta la respuesta a estrés de retículo endoplásmico pero que se encuentran en vías de señalización paralelas a la UPR¹⁰⁻¹².

1.2 La UPR de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la vía de respuesta a proteínas mal plegadas consta de una sola rama formada por las proteínas Ire1p, Hac1p, y Kar2p.

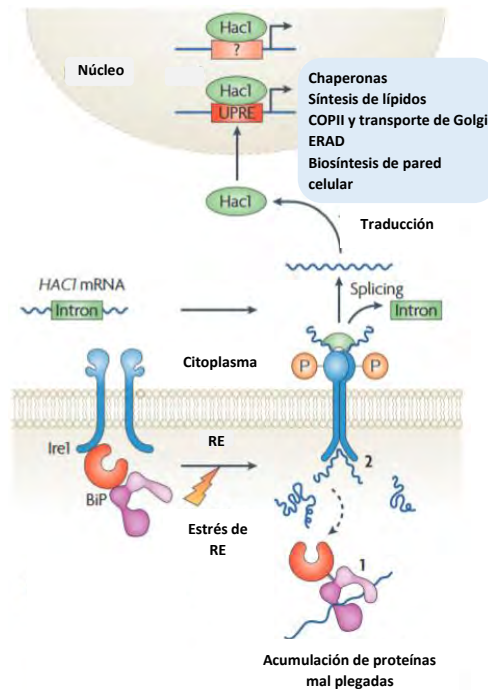


Figura 1. UPR en levaduras. En presencia de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, la chaperona Kar2p (BiP) se disocia de Ire1p (1), permitiendo que ésta se oligomerice, se autofosforile y se active (2). La activación de Ire1p culmina en el procesamiento del mRNA de *HAC1*. Tras ser procesado, *HAC1* es traducido y se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes de respuesta a ERE.

Modificado de Vembar, S.S., *et al.* ².

Kar2p es una chaperona residente del retículo endoplásmico que en condiciones normales se encuentra asociada a Ire1p. En presencia de proteínas mal plegadas, Kar2p se asocia con éstas y se disocia de Ire1p; la pérdida de esta asociación, favorece la dimerización y posterior oligomerización de Ire1p, así como su activación ^{2,7}.

Ire1p es una proteína residente del RE que contiene un dominio en el lumen, una región transmembranal y un dominio citosólico. El dominio luminal de Ire1p es capaz de reconocer proteínas mal plegadas debido a su alta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos expuestos ¹³, en tanto que en el dominio citosólico se encuentran una región con actividad de cinasa de serina/treonina, y otra región con actividad de endorribonucleasa. En condiciones de estrés de RE, Ire1p se dimeriza (y posteriormente forma oligómeros) y se transautofosforila; ambos eventos desencadenan la activación de su actividad endorribonucleasa, con la que reconoce y procesa el RNA mensajero de *HAC1* ^{2,7,14}.

Hac1p es un factor de transcripción que activa la transcripción de genes de respuesta a ERE. El mRNA de *HAC1* posee un intrón no convencional que es procesado tras la activación de Ire1p en condiciones de ERE. La remoción del intrón de *HAC1* permite que su mRNA se traduzca en una proteína funcional para responder al estrés de retículo endoplásmico^{2,14,15}.

1.3 Inductores de estrés de retículo endoplásmico.

En condiciones de laboratorio se utilizan dos tipos de inductores de ERE: agentes reductores y agentes que inhiben la glicosilación de proteínas. Ambos tipos de inductores impiden el plegamiento adecuado de las proteínas en el retículo endoplásmico y conllevan a una pérdida de la homeostasis del organelo debido a una sobrecarga de proteínas defectuosas. Por un lado, los agentes reductores destruyen los puentes disulfuro de las proteínas, provocando su desplegamiento; en esta categoría de inductores se encuentran el Ditioneitol (DTT) y el β -mercaptoetanol (β -me). Por otro lado, los agentes que afectan la glicosilación de proteínas ejercen su función al impedir el crecimiento del árbol de glicosilación de proteínas en el RE; agentes de este tipo son la tunicamicina y la 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG). La tunicamicina inhibe a la enzima Alg7p que se encarga de transferir UDP-N-acetilglucosamina al dolicol-fosfato. La N-acetilglucosamina es el primer carbohidrato en añadirse al árbol de glicosilación, por lo que la acción de la tunicamicina impide de manera específica y desde el comienzo la glicosilación de proteínas. Por su parte, la 2-desoxi-D-glucosa es un análogo de la glucosa y se incorpora al árbol de glicosilación; pero a diferencia de la glucosa, la 2-DOG impide la posterior incorporación de carbohidratos al árbol, dejándolo trunco. Un árbol de glicosilación trunco no puede incorporarse a las proteínas y detiene su procesamiento (**Figura 2**).

El uso de inductores de ERE que inhiben la glicosilación de proteínas es preferible debido a que afectan de manera directa el plegamiento de proteínas. A diferencia de los agentes que impiden la glicosilación, los agentes reductores tienen efectos en toda la célula. La alteración del estado REDOX de la célula conlleva a la activación de otras vías de respuesta a estrés que pueden confundir los resultados encontrados cuando se pretende causar ERE.

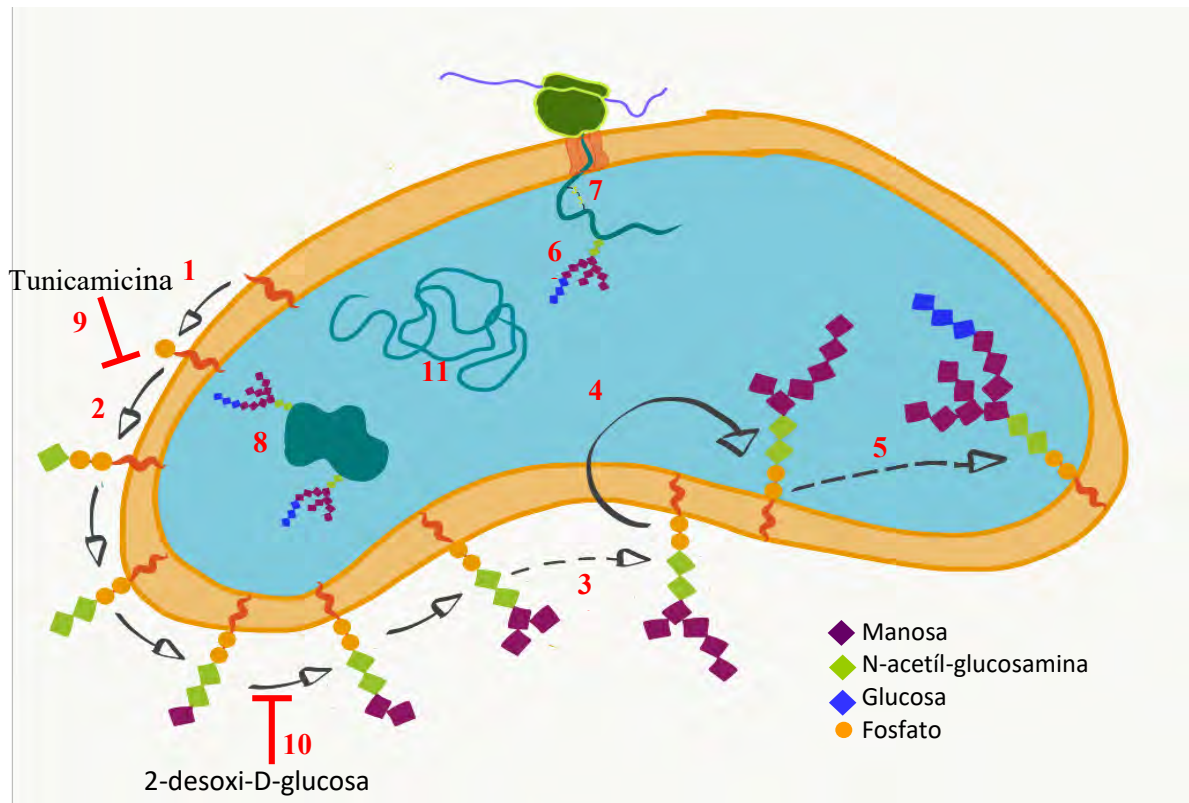


Figura 2. N-glicosilación y plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Se muestran los pasos de la formación del árbol de glicosilación en el RE y las modificaciones cotraduccionales que permiten a los polipéptidos alcanzar su correcto plegamiento. El árbol de glicosilación comienza con la fosforilación del dolicol (1), seguido por la adición de N-acetilglucosamina-fosfato (2) y la adición secuencial de una N-acetilglucosamina y cinco manosas (en la figura se omiten pasos por simplicidad) (3); este pre-árbol es translocado de la cara citoplásmica del RE al lumen (4), donde se finaliza su construcción con la adición secuencial de cuatro manosas y tres glucosas (5). El árbol de glicosilación es incorporado de manera cotraducciona a los polipéptidos dentro del RE (6), y junto con la catálisis de puentes disulfuro (7), permite a las proteínas alcanzar un plegamiento correcto (8). La tunicamicina es un inhibidor competitivo de la enzima Alg7p que cataliza la incorporación de N-acetilglucosamina-fosfato al dolicol fosfato (9), por otra parte, la 2-desoxi-D-glucosa se incorpora directamente en el árbol y trunca su crecimiento (10). Finalmente, los agentes reductores como el ditioneitol o el β -mercaptoetanol, rompen los puentes disulfuro de las proteínas. La acción de cualquiera de estos agentes evita que las proteínas alcancen su estado nativo y favorece la acumulación de proteínas desplegadas (11) en el RE.

1.4 Vía de Alta-Osmolaridad-Glicerol en estrés de retículo endoplásmico.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se vale de la vía de Alta-Osmolaridad-Glicerol (HOG) de Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) para responder a estrés osmótico, sin embargo, se ha mostrado que varias de las proteínas que participan en esta

vía son también necesarias para la supervivencia durante el ERE inducido por tunicamicina (**Figura 3**)¹⁰.

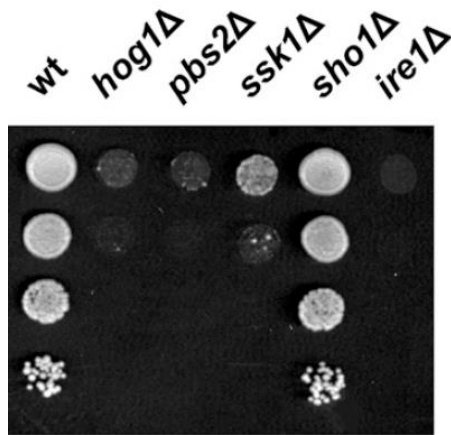


Figura 3. Vía de HOG en el estrés de retículo endoplásmico.

Mutantes nulas de genes de la vía de HOG muestran sensibilidad a tunicamicina. Se observa que la rama de Sho1p no está implicada en la respuesta a ERE. La mutante nula del regulador de respuesta Ssk1p es menos sensible a tunicamicina que las mutantes de genes del bloque de MAPKs (Pbs2p y Hog1p). Figura tomada de Torrez-Quiroz, F. *et al.*¹⁰.

La vía de HOG tiene dos ramas de señalización que convergen en la MAPKK de andamiaje Pbs2p¹⁶ (**Figura 4**); únicamente la rama de Sln1p es necesaria para responder a tunicamicina. La rama de Sln1p consta de dos módulos de señalización: un sistema de fosforrelevo y un bloque de MAPKs¹⁷⁻²⁰. Mutantes nulas para genes de ambos módulos de señalización presentan sensibilidad a tunicamicina, sin embargo, es notable que las mutantes nulas de los genes del bloque de MAPKs son más sensibles que la mutante del regulador de respuesta del fosforrelevo (**Figura 3**).

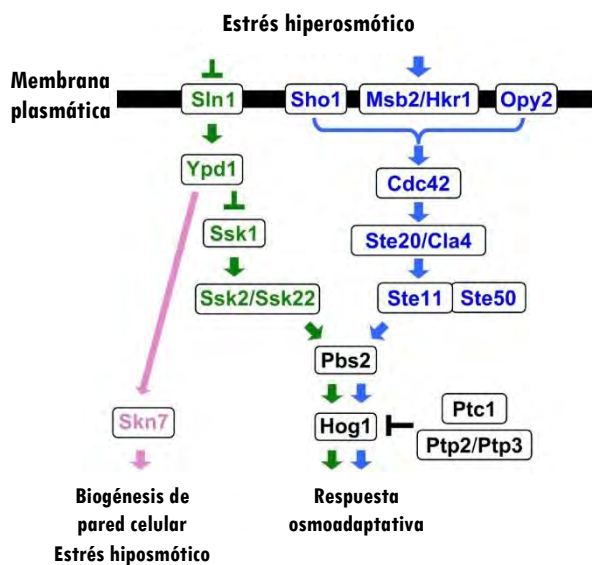


Figura 4. Vía de HOG

Vía de respuesta a estrés hiperosmótico. La vía de HOG se compone por dos ramas parcialmente redundantes que convergen en la cinasa Pbs2p. Modificado de Maeda, T. *et al.*¹⁶.

La sensibilidad a tunicamicina de las mutantes nulas de genes de la rama de Sln1p indica un entrecruzamiento de la vía de respuesta a estrés osmótico y la vía de respuesta a ERE. Tal entrecruzamiento ha sido poco estudiado, y aún no se comprende por completo de qué manera participan las proteínas de la vía de HOG en la respuesta a tunicamicina.

2. Sistemas de fosforrelevo

2.1 Señalización por fosforrelevo

Los sistemas de fosforrelevo son módulos de señalización conformados en su forma más simple por una cinasa de histidinas y un regulador de respuesta. La proteína cinasa de histidinas funge como sensor de estímulos ambientales, en tanto que el regulador de respuesta es el efector del sistema. Los sistemas de fosforrelevo más simples se denominan sistemas de dos componentes^{21,22}.

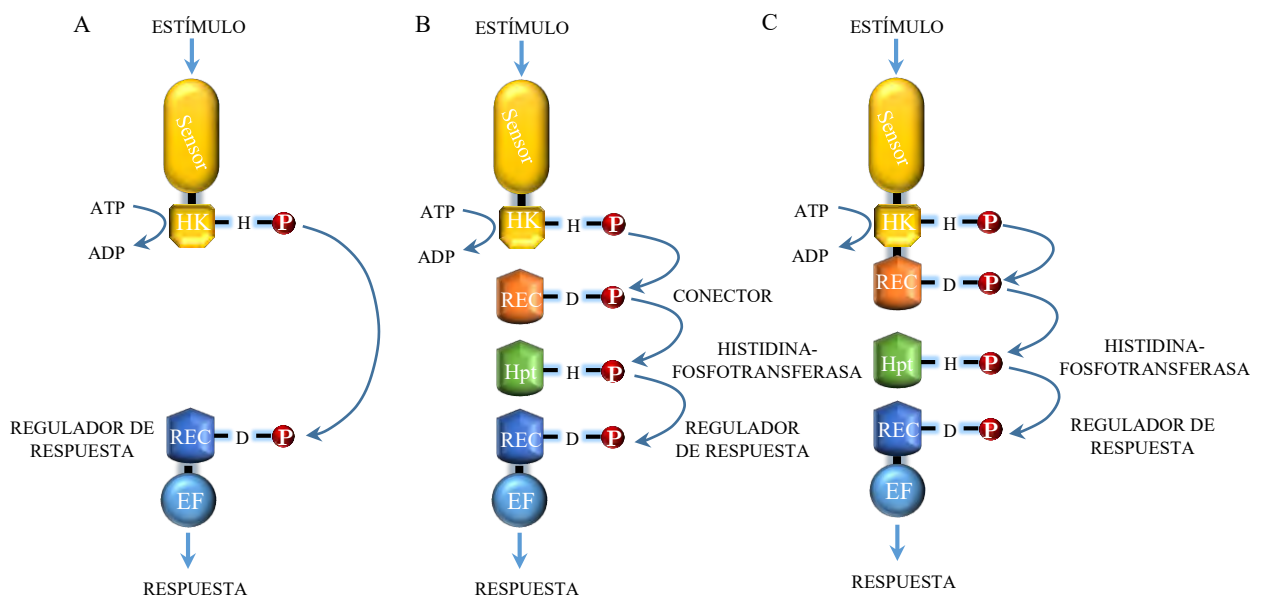


Figura 5. Sistemas de fosforrelevo. Los sistemas de fosforrelevo pueden ser de tres tipos: **A.** sistemas de dos componentes, **B.** sistemas con múltiples componentes, o **C.** sistemas híbridos. Ante un estímulo el sensor se autofosforila en el dominio HK y el fosfato es transferido secuencialmente hasta llegar al regulador de respuesta. HK: dominio histidina cinasa, REC: dominio receptor, EF: dominio efector, Hpt: dominio histidina-fosfotransferasa, P: fosfato, H: histidina, D: aspartato.

En un sistema de dos componentes, la proteína sensor tiene dos dominios principales: un dominio sensor y un dominio de histidina cinasa (HK); el regulador de respuesta tiene también dos dominios: un dominio receptor (REC) y un dominio efector (**Figura 5**).

La señalización por fosforrelevo ocurre cuando la proteína sensor se activa debido a un estímulo; al activarse, el sensor se dimeriza y se transautofosforila en un residuo de histidina aledaño al dominio HK. El fosfato es transferido del sensor hacia el regulador de respuesta en un residuo de aspartato localizado en el dominio REC del regulador. La transferencia del fosfato siempre ocurre desde un residuo de histidina hacia un residuo de aspartato. En su forma fosforilada, el regulador de respuesta se encuentra activo y puede efectuar su función. Aunque es común que la función del regulador de respuesta sea de regulación transcripcional, se han descrito reguladores de respuesta que desarrollan otro tipo de funciones²¹⁻²³.

Existen también sistemas con múltiples componentes y sistemas híbridos. En los primeros, puede haber uno o más intermediarios de transferencia de fosfato (componentes) entre la proteína sensor y el regulador de respuesta, a su vez, una sola proteína sensor puede asociarse con múltiples reguladores de respuesta. De la misma forma que en los sistemas de dos componentes, el intercambio del fosfato entre los distintos intermediarios ocurre siempre entre un residuo de histidina y un residuo de aspartato. Los sistemas híbridos son un subtipo de sistema con múltiples componentes en los que dos o más componentes se encuentran fusionados en una sola cadena polipeptídica^{22,24}.

Los sistemas de fosforrelevo son muy comunes en bacterias, donde han adoptado una gran diversidad de funciones y son un mecanismo esencial de señalización²¹. En contraste con lo que se encuentra en bacterias, en eucariotes los sistemas de fosforrelevo son poco frecuentes. Se han encontrado únicamente en plantas, hongos, y algunos amebozoa, en tanto que no se ha identificado ningún sistema de fosforrelevo en metazoarios²².

2.2 El sistema de fosforrelevo de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee únicamente un módulo de señalización por fosforrelevo^{25,26}. Este sistema está compuesto por Sln1p, una proteína sensor híbrida; Ypd1p, una histidina fosfotransferasa (Hpt); y dos reguladores de respuesta, Ssk1p y Skn7p^{17,19}.

El sistema de fosforrelevo forma parte de la vía de HOG y se encuentra río arriba del bloque de MAPKs. Sin embargo, de los dos reguladores de respuesta del sistema, únicamente Ssk1p participa en esta vía. En ausencia de estrés osmótico el sistema de

fosforrelevo se encuentra activo y la transferencia de fosfatos es constante hacia Ssk1p. Para encender la vía de HOG es necesario que Ssk1p y Ssk2p se asocien físicamente. El fosfato transferido a Ssk1p por el sistema de fosforrelevo inhibe esta interacción, por lo que en condiciones isosmóticas la vía de HOG se mantiene inactiva. En contraste, cuando la célula se encuentra en condiciones hiperosmóticas, el fosforrelevo se interrumpe y esto conlleva a que predomine la forma no fosforilada de Ssk1p. Ssk1p no fosforilada interacciona con Ssk2p y activa la vía de respuesta a alta osmolaridad¹⁷.

2.3 *Sln1p*

Sln1p es el sensor del sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae*. Es una proteína de 1220 aminoácidos localizada permanentemente en la membrana celular^{27,28}. Sln1p tiene tres regiones principales: un dominio sensor compuesto por dos segmentos transmembranales conectados por un asa extracelular, un dominio HK y un dominio REC.

El mecanismo de activación de Sln1p no se conoce con precisión, sin embargo varios reportes sugieren que la proteína responde a cambios mecánicos en la membrana celular. En condiciones normales de osmolaridad, Sln1p se mantiene catalíticamente activa y se transautofosforila en la histidina-576, cercana al dominio HK. El fosfato de la histidina-576 se transfiere al aspartato-1144 en el dominio REC de Sln1p para posteriormente ser transferido a la proteína Ypd1p¹⁷.

La ausencia de Sln1p es letal debido a una sobre activación de la vía de HOG. De la misma forma, mutaciones en el sitio catalítico de Sln1p, así como mutaciones sobre la histidina-576 o el aspartato-1144 provocan la interrupción del fosforrelevo y resultan en un fenotipo letal para la célula^{17,29}.

2.4 *Ypd1p*

Ypd1p es una proteína de 167 aminoácidos que funge como Hpt del sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae*. Ypd1p recibe el fosfato del REC de Sln1p en la histidina-64 y puede donarlo a los dominios REC tanto de Ssk1p como de Skn7p. La ausencia de Ypd1p provoca una interrupción permanente del fosforrelevo y por ende es letal para la célula¹⁷. Ypd1p no posee señales de importación ni de exportación nuclear, sin embargo por ser una proteína de menos de 60 KDa, difunde libremente entre el citoplasma y el núcleo lo que le permite interactuar tanto con Ssk1p como con Skn7p²⁷.

2.5 *Ssk1p* y *Skn7p*

El sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* cuenta con dos reguladores de respuesta que realizan distintas funciones: *Ssk1p* y *Skn7p*.

Ssk1p tiene 712 aminoácidos y dos dominios principales: un dominio de interacción con *Ssk2p* y un dominio REC. *Ssk1p* recibe el fosfato de *Ypd1p* en el aspartato-554 (D-554), dentro del dominio REC. El D-554 es esencial para la respuesta a estrés hiperosmótico¹⁷. Este regulador de respuesta se localiza de manera permanente en el citosol, donde forma una parte importante de la señalización para estrés hiperosmótico²⁷. La ausencia de *Ssk1p* oblitera la señalización por parte de la rama de *Sln1p* en la vía HOG; sin embargo, dada la redundancia parcial con la rama de *Sho1p*, una mutante nula de *SSK1* no presenta fenotipo de sensibilidad en condiciones de estrés por alta osmolaridad. El caso opuesto ocurre en el estrés de RE inducido por tunicamicina, donde la mutante *ssk1Δ* no puede crecer adecuadamente (**Figura 3**)¹⁰.

Skn7p es una proteína de 622 aminoácidos; tiene tres dominios que regulan su función: un dominio de unión con DNA (DBD; aminoácidos 86 a 189), un dominio REC (aminoácidos 379 a 488), y un dominio *coiled coil* de interacción con proteínas (CC; aminoácidos 240 a 621). Como parte del fosforrelevo, *Skn7p* recibe el fosfato de *Ypd1p* en el aspartato-427 (D-427) dentro del dominio REC^{25,30}.

La función de *Skn7p* no está completamente clara. Originalmente se identificó a *Skn7p* como un supresor de la letalidad de la mutante nula del gen *KRE9* en un ensayo de sobreexpresión³⁰. *Kre9p* es una proteína involucrada en la síntesis de β -glucano en la pared celular y su ausencia es letal para la célula. La supresión de la letalidad en el fondo *kre9Δ* requiere del D-427 de *Skn7p* y se sugiere que depende del fosforrelevo. Esta última suposición se infiere de experimentos que demuestran que una mutante de *Skn7p* en la que el D-427 es sustituido por asparagina (un aminoácido no fosforilable) no suprime la letalidad de la mutante *kre9Δ*; en contraste con este resultado, una mutante en la que el D-427 se sustituye por glutamato (aminoácido que mimetiza el estado activo del regulador de respuesta) tiene un crecimiento más robusto que la sobreexpresión del gen silvestre de *Skn7p*³¹. También se ha reportado que la mutante *skn7Δ* es sensible a agentes inductores de estrés de pared como la higromicina B³². Sumado a estos resultados se encontró que en la cepa *sln1**, una mutante que mantiene una activación excesiva de *Sln1p*, *Skn7p* se une al promotor del gen que codifica para la manosiltransferasa *Och1p*

y promueve su transcripción²⁶. Se ha reportado también que la sobreexpresión de *SKN7* puede rescatar los defectos de crecimiento de una mutante nula para la proteína reguladora de la vía de integridad de pared celular, *Pkc1p*; de manera importante, este rescate se observa también al sobreexpresar la versión no fosforilable de *Skn7p*. Además, una mutante doble *pkc1Δskn7Δ* presenta un fenotipo de letalidad sintética, lo que indica una fuerte interacción genética entre ambos genes³¹. Estos resultados sugieren que *Skn7p* participa en el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular, sin embargo es importante señalar que las evidencias que se tienen hasta ahora son indirectas y se han encontrado únicamente en sistemas que no representan la fisiología natural de la célula de levadura^{26,30,33} – en fondos genéticos alterados como el fondo *snl1** o el fondo *kre9Δ*.

El mecanismo de función mejor descrito de *Skn7p* es el de respuesta estrés oxidante. *SKN7* es un gen esencial para la supervivencia de la célula en condiciones de estrés por especies reactivas de oxígeno (ROS) dado que activa la transcripción de la mayoría de los genes para sobrevivir a este estrés^{34,35}. Una mutante nula para *SKN7* es incapaz de crecer aún en concentraciones bajas de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el *ter*-butil hidroperóxido (t-BOOH). *Skn7p* requiere unirse al factor de transcripción *Yap1p* para responder a estrés oxidante. De la misma manera que una mutante *skn7Δ*, una mutante *yap1Δ* no es viable en presencia de oxidantes. *Yap1p* se localiza en el citoplasma en condiciones normales, sin embargo, en condiciones de estrés oxidante se localiza al núcleo, donde interacciona físicamente con *Skn7p*. En conjunto, ambas proteínas activan la transcripción de genes para contender con oxidantes³⁶. En contraste con lo descrito para la homeostasis de pared, el fosforrelievo no es necesario para la función de *Skn7p* en el estrés oxidante, ya que una mutante *skn7^{D427:N}* resiste el estrés de manera idéntica a la cepa WT³⁵⁻³⁷. El grupo de Fassler encontró dos residuos esenciales para la respuesta a ROS: la treonina-449 y la treonina-437. La treonina-449 resultó ser vital para la unión de *Skn7p* con el DNA, sin importar el tipo de estrés al que se exponga la célula. En cambio, se encontró que la treonina-437 (T-437) tiene una función específica en estrés oxidante. Una célula con una versión de *Skn7p* en la que la T-437 se sustituye por alanina no sólo es incapaz de sobrevivir en presencia de ROS, sino que tampoco puede asociarse con *Yap1p* y en consecuencia no puede funcionar como activador transcripcional en condiciones de estrés oxidante^{35,36}.

Además de lo ya expuesto, se han descrito distintas asociaciones funcionales de *Skn7p* con otros genes, sin embargo no se ha ahondado en el estudio de las mismas y su

relevancia es desconocida. Se ha reportado una asociación física y genética con la proteína intercambiadora de nucleótidos Mog1p y se describe que Mog1p es necesaria para mantener la localización nuclear de Skn7 en condiciones de estrés por calor³⁸. También se ha encontrado una asociación funcional de Skn7p con los complejos de represión transcripcional Tup1-Ssn6³⁹ y Ccr4-Not⁴⁰. De manera relevante, se reportó una interacción genética y física entre Skn7p y el factor de transcripción dependiente de Calcineurina, Crz1p³²; esta asociación se describirá con detalle más adelante debido a su importancia para el presente trabajo.

3. Crz1p y la respuesta dependiente de calcio

3.1 Señalización mediada por calcio

El ion Ca^{++} es un segundo mensajero de gran importancia en las células eucariotas. La señalización mediada por calcio cumple distintas funciones y está conservada en todos los organismos modelo eucariotas estudiados a la fecha^{4,41}. El calcio intracelular se halla secuestrado en los distintos organelos, siendo el RE mayor reservorio en mamíferos y la vacuola en levaduras. Esta compartimentalización del calcio permite que la concentración citosólica del ion sea de uno a dos órdenes de magnitud menor que en el medio externo^{3,4}. Distintos estímulos pueden ocasionar la expulsión del calcio de los compartimentos celulares, provocando un incremento súbito en concentración del catión en el citosol. El aumento en la concentración citosólica de calcio es detectado por la proteína Calmodulina. Calmodulina es una proteína con dominios de unión de Calcio que está conservada en todos los eucariotes y es esencial para la señalización mediada por calcio. En su forma activa (asociada a calcio), Calmodulina interacciona con la fosfatasa Calcineurina y la activa. Calcineurina tiene distintas proteínas blanco, sin embargo los blancos más importantes son los factores de transcripción dependientes de calcio, ya que coordinan gran parte de la respuesta inducida por la expulsión de calcio, así como el restablecimiento de la concentración citosólica e intraorganelar del catión^{4,41}.

En levaduras la señalización por calcio es activada por distintos estímulos como son el estrés inducido por cationes (Al^{+++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Li^+ , K^+ y Na^+), cafeína, etanol, alta temperatura, luz azul y pH básico^{4,5}. Al igual que en otros eucariotes, en *S. cerevisiae* los picos de calcio en el citosol son detectados por la proteína Calmodulina (Cmd1p) y el efector catalítico de la vía es la Calcineurina. La Calcineurina de levadura

está constituida por dos subunidades: Cnb1p, la subunidad reguladora; y Cna1-2p, la subunidad catalítica. El genoma de *S. cerevisiae* posee dos genes parálogos con funciones parcialmente redundantes para la subunidad catalítica: *CNA1* y *CNA2*; en la proteína completa solamente una de estas subunidades está presente⁴². El principal blanco de la Calcineurina es el factor de transcripción dependiente de calcio Crz1p, que coordina prácticamente toda la respuesta transcripcional de la vía de calcio^{41,43}. La homeostasis del calcio se recupera gracias a varios transportadores y ATPasas que transportan el calcio citosólico de vuelta a los distintos organelos.

3.2 *Crz1p*

Crz1p es un factor de transcripción de dedos de zinc que coordina la respuesta transcripcional dependiente de calcio. Se ha reportado que Crz1p regula 116 genes con distintas funciones⁴³. Entre los genes regulados por Crz1p destacan la ATPasa vacuolar de calcio, *PMCI*, y la subunidad de la 1,3-glucano sintasa, *FKS2*, porque han sido utilizados como marcadores de la actividad del factor de transcripción^{4,32}.

Crz1p se localiza de forma habitual en el citoplasma de la célula. Esta localización depende de que la proteína se encuentre hiperfosforilada. Cuando se activa la señalización por calcio, Calcineurina desfosforila a Crz1p y ésta es transportada al núcleo⁴⁴. La importación a núcleo de Crz1p es mediada por la importina Nmd5p⁴⁴. Una vez localizada en el núcleo Crz1p se une a los promotores en secuencias específicas denominadas Elementos de Respuesta Dependientes de Calcineurina (CDREs, por sus siglas en inglés) y promueve la transcripción^{4,41,43}. Cinasas no identificadas refosforilan a Crz1p en el núcleo, lo que favorece su exportación al citoplasma por la exportina Msn5p⁴⁵.

3.3 *Crz1p* y *Skn7p*.

En el 2001, el grupo de Cyert reportó una interacción física y genética entre Skn7 y Crz1. Esta interacción fue encontrada en un estudio de sobreexpresión en el que se buscaron genes que incrementaran la transcripción dependiente de Calcineurina. En este estudio, una mutante nula de *SKN7* mostró expresión disminuida de los genes *PMCI* y *FKS2* en condiciones de estrés inducido por calcio; además se evaluó un reportero de β -galactosidasa bajo el control del CDRE y su expresión también se encontró afectada en la mutante *skn7 Δ* . Se mostró también que Skn7p favorece la estabilidad de la proteína de Crz1p; una mutante de Skn7p no fosforilable en el D-427 tiene el mismo fenotipo que el gen silvestre. Por último en este artículo se encontró que Skn7p y Crz1p presentan

interacción física *in vitro* y que esta interacción no depende de la presencia del aspartato fosforilable por el fosforrelevo³².

Planteamiento del problema y justificación

Previo a este trabajo, se conocían dos posibles funciones con mecanismos moleculares distintos de Skn7p en la fisiología celular: la supresión del estrés oxidante y la regulación de la homeostasis de la pared celular. Un reporte aislado relacionó a la proteína con la homeostasis del calcio. Tanto el estrés oxidante, como la homeostasis del calcio y de la pared celular, son eventos que dependen de forma directa del adecuado funcionamiento del retículo endoplásmico, por lo que podría esperarse la existencia de un regulador maestro en el que converjan las señales de estas tres entidades y se interpreten en el contexto de la homeostasis del RE. Hasta ahora, la participación de Skn7p en la respuesta a ERE únicamente había sido reportada en estudios de gran escala; no obstante, los antecedentes que se tienen sobre su función sugieren que Skn7p podría ser un punto de convergencia en la señalización encargada de preservar la homeostasis del RE. Esta posibilidad motivó que en la presente tesis se estudiara a Skn7p en el contexto del ERE y los mecanismos moleculares que regulan su función en estas condiciones.

Hipótesis

Los reguladores de respuesta Ssk1p y Skn7p permiten la supervivencia a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina y 2-DOG mediante un mecanismo independiente del fosforrelevo.

Objetivo general

Identificar los mecanismos moleculares subyacentes a la función de los reguladores de respuesta Ssk1p y Skn7p en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico.

Resultados

Skn7p participa en la respuesta a ERE

Se realizó un ensayo de sensibilidad por goteo para comprobar si el regulador de respuesta *Skn7p* tiene una función en la respuesta a inductores de ERE y corroborar el fenotipo reportado en estudios de gran escala en donde se planteó que la cepa es sensible a tunicamicina⁴⁶.

Para esto se goteó la mutante nula de *SKN7* en medio sólido con los siguientes inductores de ERE: 1 µg/mL de tunicamicina y 2-desoxi-D-glucosa a 3.5mM. La mutante *skn7Δ* presentó un fenotipo de sensibilidad moderada a tunicamicina (**Figura 6**). Además, a diferencia de la mutante nula de la MAPK Hog1p, *skn7Δ* resultó ser sensible a 2-DOG. Esta diferencia, sumada a la menor sensibilidad a tunicamicina de *skn7Δ* con respecto a *hog1Δ*, llevó a pensar que ambas proteínas podrían tener funciones independientes en la respuesta a ERE.

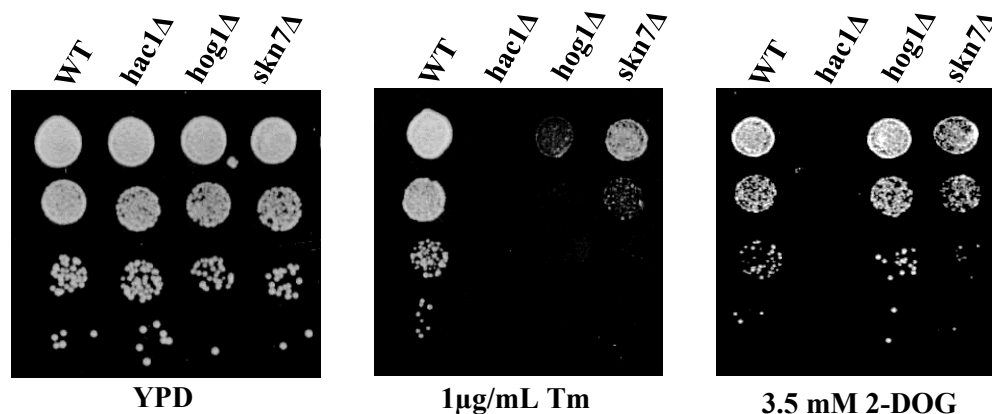


Figura 6. La mutante *skn7Δ* es sensible a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Se comparó el fenotipo de mutante *hog1Δ* con el fenotipo de *skn7Δ*. La mutante *hac1Δ* se utilizó como control positivo de sensibilidad. Tm: tunicamicina. 2-DOG: 2-desoxi-D-glucosa.

Para comprobar si *Skn7p* y *Hog1p* forman parte de una misma ruta de señalización en respuesta a ERE se generó la doble mutante *skn7Δhog1Δ*. Esta mutante se probó en ensayos de sensibilidad por goteo bajo condiciones de estrés inducido por tunicamicina y se observó que su fenotipo de sensibilidad es mayor al de las mutantes sencillas *skn7Δ* y *hog1Δ* (**Figura 7**). Este resultado sugiere que pese a formar parte de la rama de *Sln1* en

la vía de respuesta a estrés osmótico²⁶, Skn7p no se encuentra dentro de la misma vía de señalización en la respuesta a estrés inducido por tunicamicina.

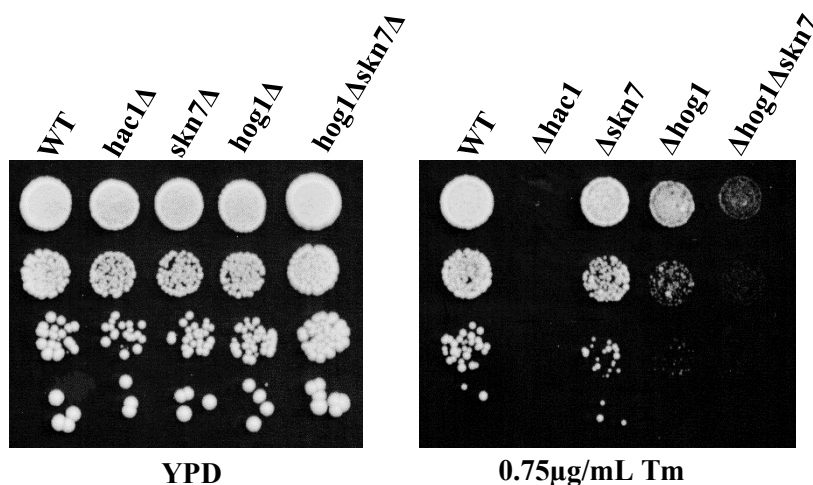


Figura 7. La doble mutante *skn7*Δ*hog1*Δ es más sensible que las mutantes sencillas a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Se comparó el fenotipo de las mutantes sencillas *Δhog1* y *Δskn7* con el fenotipo de la doble mutante *Δskn7*Δ*hog1*. Tm: tunicamicina.

Participación de los reguladores de respuesta del sistema de fosforrelevo en la respuesta a ERE

En estudios previos se mostró que la mutante nula del regulador de respuesta Ssk1p es sensible a tunicamicina¹⁰; sin embargo su fenotipo de sensibilidad es menor que el de la mutante *hog1*Δ (**Figura 3**). Este antecedente y el fenotipo de la mutante nula del regulador de respuesta Skn7p parecen implicar al sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico.

Se comparó mediante un ensayo de sensibilidad por goteo el fenotipo de sensibilidad de las mutantes nulas de los dos reguladores de respuesta, Skn7p y Ssk1p. En estos ensayos (**Figura 8A**) se observó que ambas mutantes nulas presentan fenotipos casi idénticos en tunicamicina. No obstante, la doble mutante *ssk1*Δ*skn7*Δ tuvo un fenotipo de sensibilidad más fuerte que las mutantes sencillas. Este experimento se replicó con curvas de crecimiento para obtener mayor resolución en la diferencia de fenotipos, y se replica lo observado en los goteos (**Figura 8B**); con lo que sugiere que las dos proteínas son parte de vías distintas en la respuesta a ERE inducido por tunicamicina.

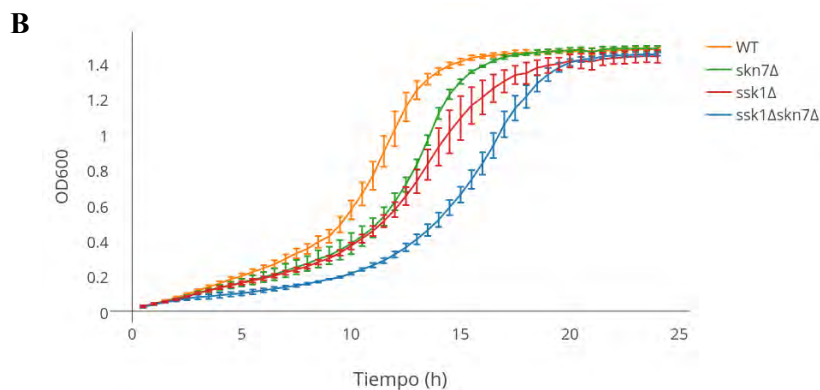
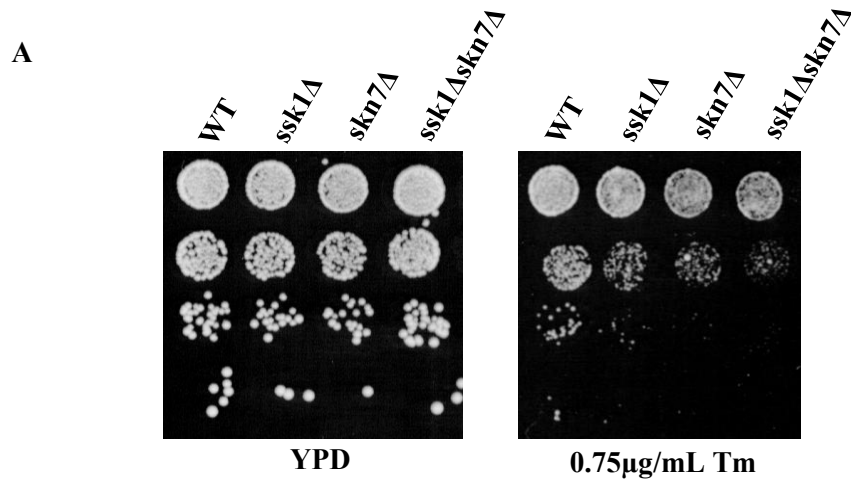


Figura 8. La doble mutante *ssk1*Δ*skn7*Δ es más sensible que las mutantes sencillas a tunicamicina. A) Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. **B)** Curvas de crecimiento realizadas en YPD con 1µg/mL Tm. Se comparan las mutantes sencillas *ssk1*Δ y *skn7*Δ con el fenotipo de la doble mutante *ssk1*Δ*skn7*Δ. Tm: tunicamicina. Barras representan desviación estándar.

Participación del fosforrelevo en el ERE

Si bien los dos reguladores de respuesta del sistema de fosforrelevo de la levadura participan en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico, resulta necesario probar si esta función requiere de la estimulación de los reguladores mediante el fosfato proveniente del fosforrelevo. Para explorar esta posibilidad, se utilizaron mutantes puntuales incapaces de recibir el fosfato proveniente de Sln1p.

Se construyó una mutante del gen *SKN7* incapaz de aceptar el fosfato proveniente del fosforrelevo. Para esto se cambió el codón que codifica para el aspartato aceptor por un codón que codifica para alanina. Esta construcción se clonó en el plásmido pYES2, que

posee un promotor inducible por galactosa (P_{gal4}). A su vez, se clonó la versión silvestre del gen ($SKN7^+$) en el mismo vector. Se transformó a la cepa $skn7\Delta$ con estas construcciones y se probó su fenotipo a tunicamicina y a 2-DOG. Los ensayos de sensibilidad por goteo mostraron que tanto el gen silvestre como el gen mutado recuperan el fenotipo silvestre tanto en tunicamicina como en 2-desoxi-D-glucosa (**Figura 9**). Este resultado sugiere que la respuesta a ERE no requiere que Skn7p sea capaz de aceptar el fosfato proveniente del sistema de fosforrelevo.

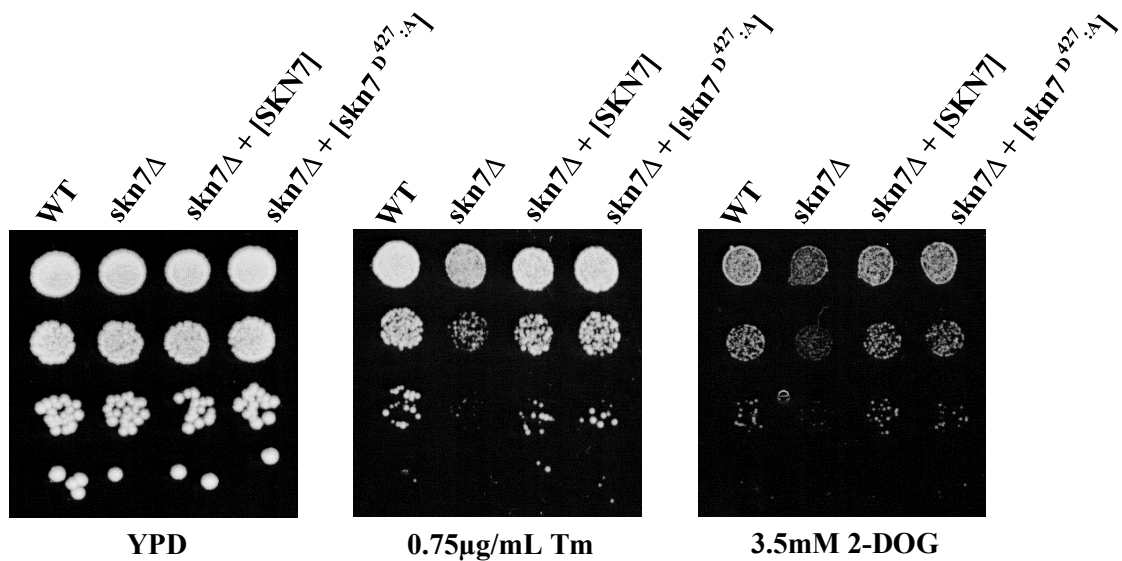


Figura 9. La mutante no fosforilable del gen $SKN7$ cura el fenotipo de sensibilidad a tunicamicina. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. La mutante nula $skn7\Delta$ fue transformada con el gen silvestre ($SKN7^+$), con una mutante no fosforilable del gen ($skn7^{D427:A}$), o con el vector vacío. Tm: tunicamicina. 2-DOG: 2-desoxi-D-glucosa. Células previamente incubadas en medio con galactosa.

Para evaluar la importancia del aspartato aceptor en Ssk1p se utilizó una construcción previamente elaborada en el laboratorio (Cruz U. y Kawasaki L., no publicado), en la que el aspartato aceptor fue sustituido por una alanina. Esta construcción se encuentra clonada en el vector pYES2, al igual que el gen silvestre $SSK1^+$. Se transformó la cepa $ssk1\Delta$ con ambas construcciones y se probó su fenotipo en tunicamicina con ensayos de sensibilidad por goteo. Como se observa en la **figura 10**, tanto la versión mutante del gen como el gen silvestre fueron capaces de curar el fenotipo de sensibilidad a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina. Este resultado sugiere que al igual que Skn7p, Ssk1p tampoco necesita recibir el fosfato del sistema de fosforrelevo para llevar a cabo su función en la respuesta a ERE.

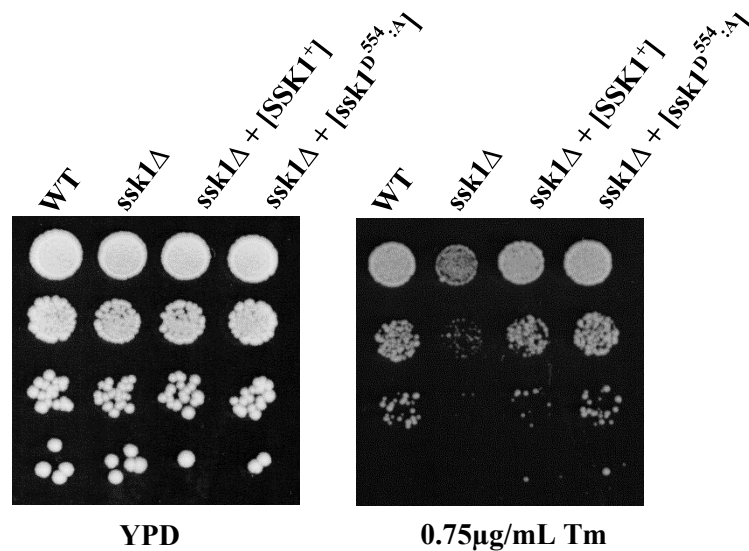


Figura 10. La versión no fosforilable del gen *SSK1* cura el fenotipo de sensibilidad tunicamicina. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. La mutante nula $\Delta ssk1$ fue transformada con el gen silvestre (*SSK1*⁺), con una versión no fosforilable del gen (*ssk1*^{D554:A}), o con el vector vacío. Tm: tunicamicina. Células previamente incubadas en medio con galactosa.

Papel de los factores de transcripción activados por estrés oxidante en condiciones de ERE.

Dado que no se encontró una dependencia de la transferencia de fosfato en la función de Skn7p en la respuesta a ERE, se evaluó si su participación depende de su capacidad como regulador de la respuesta a estrés oxidante. Como se mencionó con anterioridad, en la respuesta a estrés oxidante el factor de transcripción Yap1p interacciona físicamente con Skn7p. Dado que esta interacción es obligatoria para la supervivencia a oxidantes, se evaluó el fenotipo de una mutante nula de *YAP1* y de la doble mutante *yap1Δskn7Δ* en condiciones de ERE. Contrario a lo reportado en estudios de gran escala, la mutante *yap1Δ* no mostró sensibilidad a los inductores de ERE. Como era de esperar, la doble mutante *yap1Δskn7Δ* mostró un fenotipo idéntico al de la mutante sencilla *skn7Δ* (**Figura 11**).

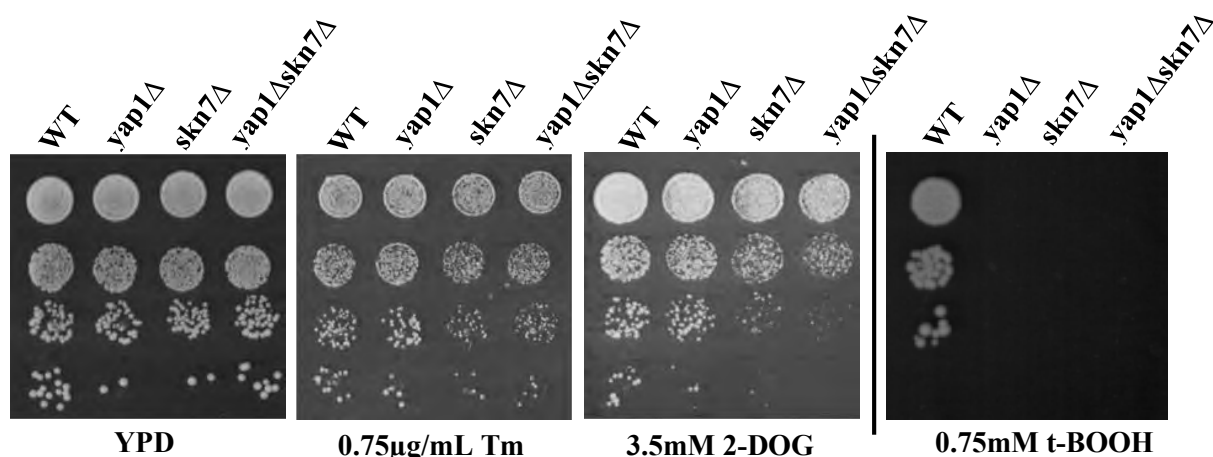


Figura 11. Yap1p no se requiere para responder a ERE. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Se compara el fenotipo de las mutantes sencillas *yap1*Δ y *skn7*Δ con el fenotipo de la doble mutante *yap1*Δ*skn7*Δ. Se utilizó ter-butil hidroperóxido como control positivo de estrés oxidante. Tm: tunicamicina. 2-DOG: 2-desoxi-D-glucosa. t-BOOH: ter-butil hidroperóxido.

De manera complementaria a los ensayos de sensibilidad, se evaluó la acumulación de ROS en la mutante nula de *SKN7* al inducir ERE. En un ensayo realizado con el reactivo H₂DCFDA para la detección de ROS intracelulares se observó que la inducción de ERE con 1μg/mL tunicamicina o con 3.5mM de 2-DOG provoca la acumulación de ROS en la cepa silvestre y en la mutante desde las dos horas de inducción; sin embargo no se encontraron diferencias notables en la cantidad de ROS entre la mutante y la cepa silvestre (**Figura 12; Anexo II**). Este resultado aunado al análisis de sensibilidad, sugiere que la participación de Skn7p en la respuesta a ERE no se relaciona con su función como regulador de la respuesta a estrés oxidante.

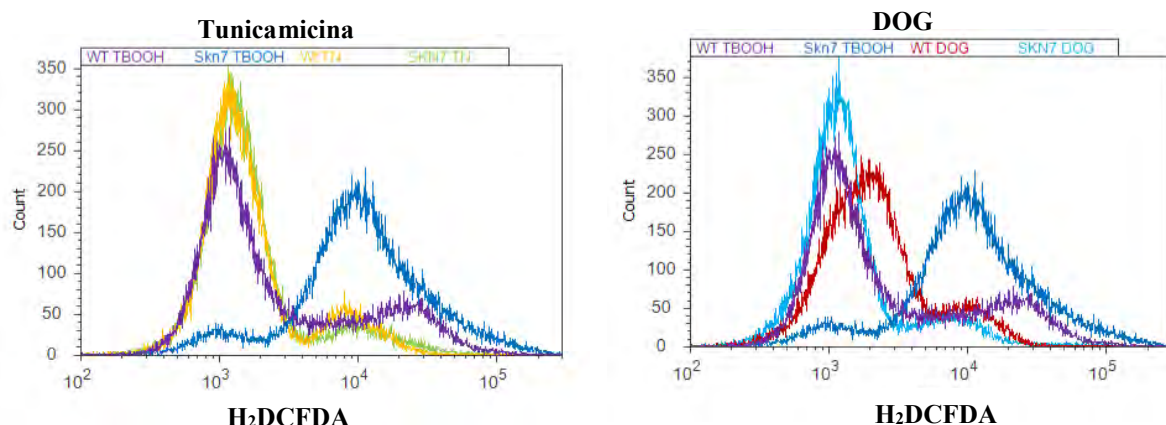


Figura 12. La mutante *skn7Δ* no acumula más ROS que la cepa silvestre en condiciones de ERE. Ensayo de acumulación de ROS por oxidación de H₂DCFDA cuantificado por citometría de flujo. Se compara la mutante *skn7Δ* con el fenotipo cepa silvestre en condiciones de ERE; se utiliza ter-butil hidroperóxido como control positivo de estrés oxidante. TN: tunicamicina. DOG: 2-desoxi-D-glucosa. TBOOH: ter-butil hidroperóxido.

	YPD		TBOOH		Tunicamicina		2-DOG	
	Media de intensidad/ % Células	Mediana de intensidad/ % Células	Media de intensidad/ % Células	Mediana de intensidad/ % Células	Media de intensidad/ % Células	Mediana de intensidad/ % Células	Media de intensidad/ % Células	Mediana de intensidad/ % Células
WT _G	861 / 100%	768 / 100%	861 / 100%	768 / 100%	861 / 100%	768 / 100%	861 / 100%	768 / 100%
<i>skn7Δ</i> _G	861 / 100%	768 / 100%	14 263 / 100%	8 762 / 100%	861 / 100%	768 / 100%	861 / 100%	768 / 100%
WT _{R1}	763 / 82.26%	636 / 82.26%	1673 / 72.94%	1250 / 72.94%	1489 / 83.6%	1324 / 83.6%	2165 / 86.26%	1868 / 86.26%
<i>skn7Δ</i> _{R1}	1094 / 87.9%	868 / 87.9%	1230 / 8.38%	1106 / 8.38%	1558 / 87%	1361 / 87%	1371 / 87.57%	1210 / 87.57%
WT _{R2}	12 848 / 17.4%	11 880 / 17.4%	23 793 / 25.92%	20 119 / 25.92%	10 407 / 15.33%	9075 / 15.33%	12 640 / 12.87%	11 432 / 12.87%
<i>skn7Δ</i> _{R2}	16 411 / 11.74%	15 066 / 11.74%	20 198 / 91.71%	11 480 / 100%	14 341 / 11.93%	11 521 / 11.93%	9441 / 10.98%	8 412 / 10.98%

Tabla 1. Intensidades de fluorescencia en ensayo de acumulación de ROS. Ensayo de acumulación de ROS por oxidación de H₂DCFDA cuantificado por citometría de flujo. Se tabulan los valores de intensidad de fluorescencia (media y mediana) de la mutante *skn7Δ* y de la cepa silvestre en condiciones de ERE; se utiliza ter-butil hidroperóxido como control positivo de estrés oxidante. TN: tunicamicina. DOG: 2-desoxi-D-glucosa. TBOOH: ter-butil hidroperóxido. R1: ventana 1 (Ver Anexo II). R2: ventana 2 (Ver Anexo II).

Interacción genética entre Skn7p y Crz1p

Como se mencionó anteriormente, Skn7p y Crz1p pueden interaccionar *in vitro* y esta interacción no se pierde si se muta el aspartato aceptor del fosforrelevo en Skn7p. Además, Crz1p se transloca al núcleo al ser activada por la vía de respuesta dependiente de calcio. Por estos antecedentes, se evaluó el fenotipo de una mutante nula para el gen *CRZ1*. Se observó que en presencia de tunicamicina la mutante *crz1Δ* resultó tan sensible como la mutante *skn7Δ* (**Figura 13**); no se observaron defectos de crecimiento para *crz1Δ* en condiciones ERE inducido por 2-DOG (resultados no mostrados). Este fenotipo indica que Crz1p es necesario para la respuesta a ERE inducido por tunicamicina y la similitud en la intensidad de la sensibilidad de *crz1Δ* y *skn7Δ* sugiere que estas proteínas podrían participar dentro del mismo sistema de señalización.

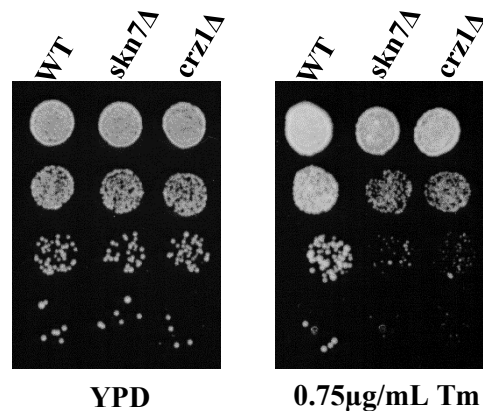


Figura 13. La mutante *crz1Δ* presenta fenotipo de sensibilidad a tunicamicina. Ensayo de sensibilidad por goteo a tunicamicina. Se compara el fenotipo de la mutante *skn7Δ* con la mutante *crz1Δ*. Tm: tunicamicina.

Para determinar si Crz1p y Skn7p forman parte de la misma vía de señalización en presencia de tunicamicina se construyó la doble mutante *crz1Δskn7Δ*. Como se puede notar en la **Figura 14** esta mutante presenta un fenotipo de letalidad sintética, lo que permite inferir que existe una fuerte interacción genética entre Crz1p y Skn7p.

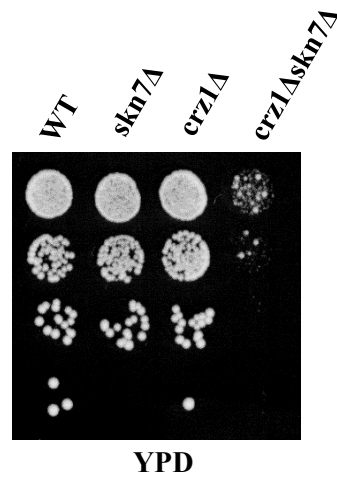


Figura 14. La mutante *crz1*Δ*skn7*Δ presenta fenotipo de letalidad sintética. Ensayo de sensibilidad por goteo en ausencia de inductores de estrés. Se compara el fenotipo de las mutantes sencillas *skn7*Δ y *crz1*Δ con la doble mutante *crz1*Δ*skn7*Δ.

Participación de Calcineurina en la respuesta a ERE

Dada la clara interacción genética entre Skn7p y Crz1p, se decidió evaluar otros genes de la vía de respuesta a calcio en la respuesta a ERE. Se evaluó el fenotipo de mutantes nulas para los genes que codifican las subunidades catalíticas y reguladora de Calcineurina, proteína que se encuentra río arriba de Crz1p en la vía de respuesta a calcio. Mediante ensayos de sensibilidad por goteo se observó que sólo uno de los dos genes parálogos que pueden conformar la subunidad catalítica es sensible a inductores de ERE. A la par, se encontró que la mutante del gen que codifica para la subunidad reguladora Cnb1p presenta un fenotipo extremo de sensibilidad a tunicamicina, no obstante este fenotipo no se repite en 2-DOG, donde el fenotipo de sensibilidad es moderado (**Figura 15**).

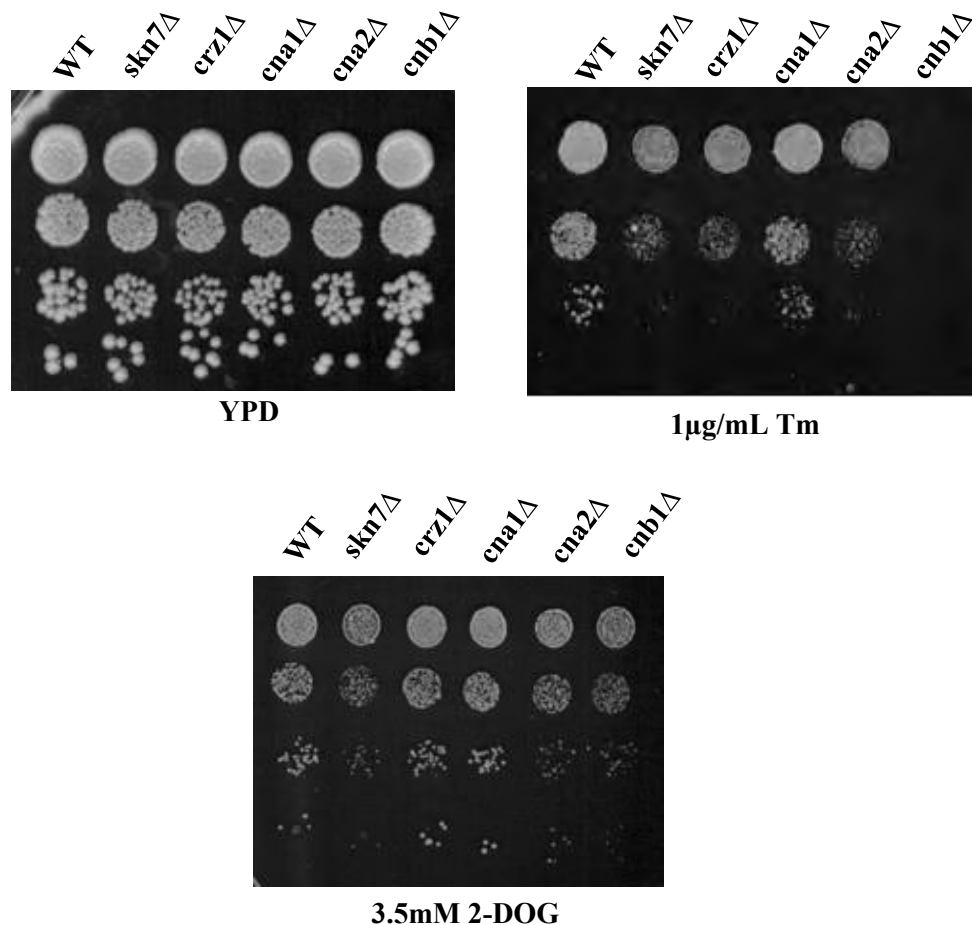


Figura 15. Sensibilidad a inductores de ERE en mutantes nulas de la vía de respuesta a calcio. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo endoplásmico. Se evalúa el fenotipo de mutantes nulas de la vía de calcio: se comparan las mutantes para las subunidades de Calcineurina y para los factores de transcripción Skn7p y Crz1p. Tm: tunicamicina. 2-DOG: 2-desoxy-D-glucosa.

Localización de Crz1p durante el ERE.

Para evaluar una posible interacción física entre Skn7p y Crz1p es importante considerar la localización de ambas proteínas en condiciones de estrés de retículo endoplásmico. Como se mencionó anteriormente, Skn7p reside permanentemente en el núcleo; no así Crz1p, cuya localización en ausencia de estrés es citoplásmica. Se estudió la localización de Crz1p en condiciones de estrés inducido por tunicamicina. Para esto se utilizó una versión de Crz1p fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Se estimuló a las células con 1 μg de tunicamicina en diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 min) y se observó la localización de Crz1-GFP mediante microscopía de epifluorescencia. Se observó un cambio en la localización de Crz1-GFP en condiciones de ERE a las dos horas de

estimulación. En la **Figura 16** se observa el cambio de localización de Crz1-GFP tras dos horas de tratamiento con tunicamicina; se puede observar que Crz1-GFP co-localiza con el marcador de núcleo DAPI. Se cuantificó el porcentaje de células en las que CRZ1-GFP fue encontrado en el núcleo, y se obtuvieron los siguientes valores: 71.3% \pm 14 para las células tratadas con tunicamicina, y 4% \pm 3.8 en el control. Este resultado muestra que Crz1p comparte la misma localización subcelular que Skn7p en condiciones de estrés. Lo que apoyaría la hipótesis de interacción física entre ambas proteínas.

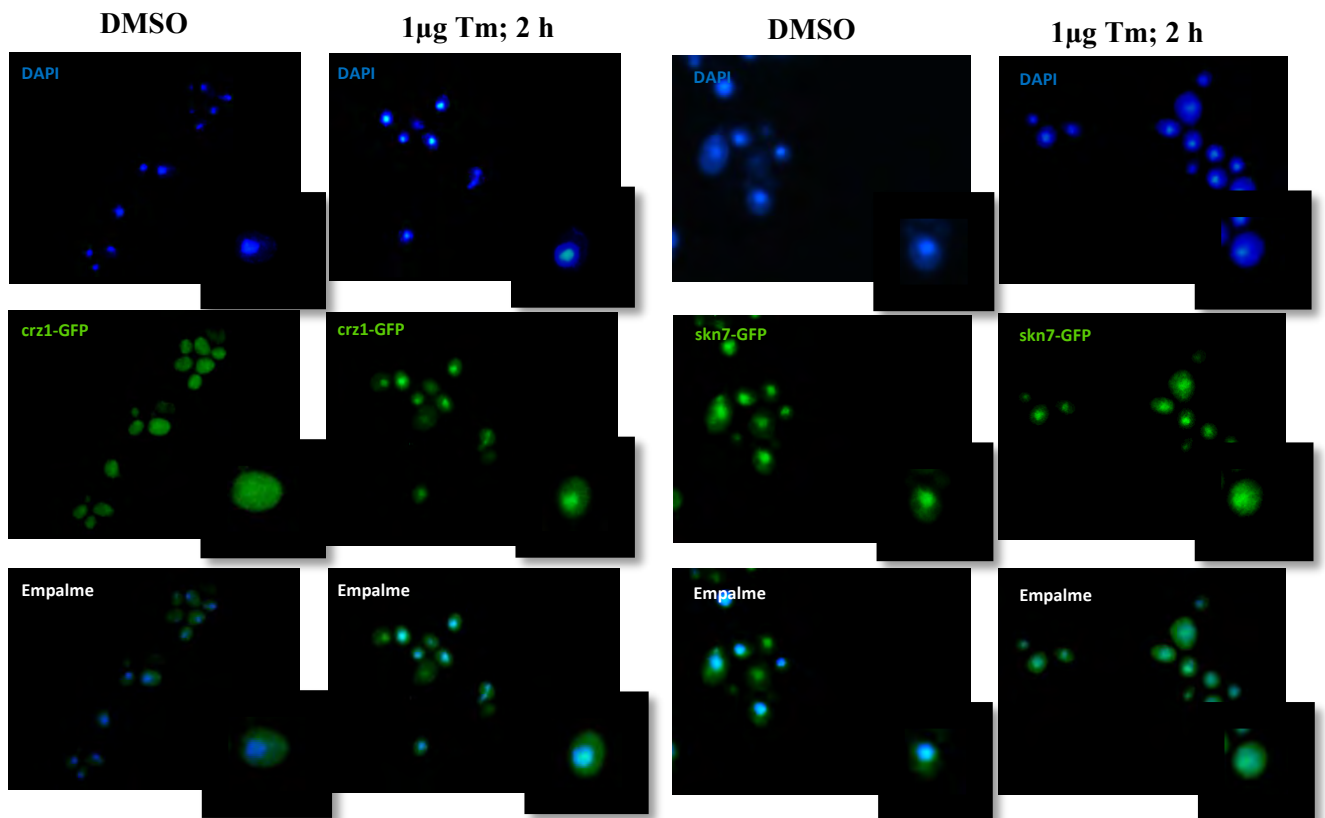


Figura 16. *CRZ1-GFP* cambia su localización en presencia de tunicamicina. Ensayo de localización por microscopía de epifluorescencia. Se evaluó la localización de *CRZ1-GFP* y de *SKN7-GFP* en condiciones control (DMSO) y en condiciones de ERE inducido por tunicamicina. Tm: tunicamicina. h: horas. Número de Aumentos Totales: 1500X

Discusión

El retículo endoplásmico es un organelo central en la función celular; de este organelo depende la adecuada síntesis y el correcto plegamiento de aproximadamente un tercio de las proteínas de la célula. Además de ser el primer paso en la síntesis de proteínas de la vía secretora, el RE tiene un papel importante en la síntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio^{6,47}. Las funciones del RE están interconectadas; es por esto que defectos en cualquiera de estas funciones inducen la pérdida de la homeostasis del organelo y provocan estrés. El sensor de la UPR se activa directamente por las proteínas mal plegadas⁴⁸, sin embargo entre los genes regulados por esta vía se encuentran también proteínas implicadas en síntesis de lípidos y homeostasis del calcio^{2,7,8}. Debido a esta diversidad de funciones y a la multiplicidad de sitios a los que se dirigen las proteínas sintetizadas en el RE, la pérdida de la homeostasis del organelo causa a largo plazo que se afecten otras funciones celulares no directamente relacionadas con el RE. Es quizá a causa de esto que varias vías de respuesta a estrés se activan tardíamente como consecuencia del ERE^{10,11,49}.

Skn7p participa en la respuesta a ERE

Los mecanismos de función de Skn7p han sido elusivos. Antes de este trabajo se había relacionado a dicha proteína con estrés de pared y con estrés oxidante^{30,31,35-37}; aunque una serie de estudios aislados han reportado que su presencia es necesaria para distintas condiciones sin llegar en ninguno de los casos a especificar los mecanismos de su funcionamiento^{36,38-40}. Pese a que la función de Skn7p en respuesta a estrés oxidante está descrita con detalle, este no es el caso para el estrés de pared, donde los datos son poco concluyentes o están descritos en fondos genéticos alterados.

El fenotipo de sensibilidad a tunicamicina de la mutante nula de *SKN7* fue reportado previamente en ensayos a gran escala⁴⁶, no obstante no había sido curado manualmente. En este trabajo se corroboró el fenotipo reportado en ensayos a gran escala para Skn7p. Además se encontró que a diferencia de otras mutantes de la vía de Sln1, *skn7Δ* es también sensible a 2-DOG y su fenotipo de sensibilidad en tunicamicina es menos intenso. Estas diferencias puntuales dejaron abierta la posibilidad de que Skn7p tuviera una regulación distinta a las demás proteínas de la vía de Sln1 en la respuesta a ERE. Lo que fue posteriormente comprobado al evaluar el fenotipo en tunicamicina de la mutante *skn7Δhog1Δ*.

Tanto la 2-DOG como la tunicamicina afectan la glicosilación de proteínas. A largo plazo, esto conlleva a que se pierda la homeostasis de la pared celular, debido a que la adecuada estructuración de este componente celular depende de la presencia de distintas proteínas glicosiladas⁵⁰. Considerando lo anterior y de acuerdo con lo reportado para el regulador de respuesta Skn7p, la función más probable de esta proteína en respuesta a ERE sería la de contender con el estrés de pared celular derivado del ERE. No obstante, también es posible que la función de Skn7p en la respuesta a ERE se relacione con la homeostasis REDOX o con la homeostasis del calcio, ya que ambas condiciones se alteran como consecuencia del ERE por proteínas mal plegadas.

Participación de los reguladores de respuesta del sistema de fosforrelevo en respuesta a ERE

Aunque forman parte del mismo bloque de señalización, los reguladores de respuesta Ssk1p y Skn7p cumplen funciones muy distintas dentro de la célula. Además, Skn7p es regulada de manera independiente del fosforrelevo en respuesta a ROS³⁵. Por esto, era importante evaluar si ambas proteínas se encuentran dentro del mismo bloque de señalización o si forman parte de vías paralelas. Esta posibilidad se evaluó con la mutante *ssk1Δskn7Δ* que mostró un fenotipo aditivo de sensibilidad, que sugiere una regulación separada para ambos reguladores de respuesta.

El aspartato aceptor del fosforrelevo pudo ser sustituido por un aminoácido no fosforilable en ambos reguladores de respuesta sin que esto afecte la supervivencia a ERE. Este resultado fue inesperado para Ssk1p dado no se han descrito funciones independientes del fosforrelevo para esta proteína. Por otra parte, las evidencias iniciales que relacionan a Skn7p con la homeostasis de pared celular indican que esta función requiere del aspartato aceptor, sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo sugieren que Skn7p no cumple una función relacionada a la pared celular en condiciones de ERE o que esta función no depende del aspartato aceptor.

Papel de los factores de transcripción activados por estrés oxidante en condiciones de ERE.

Para facilitar la formación de puentes disulfuro y el correcto plegamiento de las proteínas, el RE debe mantener un microambiente oxidante con respecto al citoplasma. En condiciones de ERE la célula eleva la producción de ROS para incrementar la capacidad de plegamiento del RE^{51,52}.

Skn7p, es uno de los dos factores de transcripción esenciales para contender con el estrés inducido por la acumulación de ROS. Debido a esta función, se pensó que la sensibilidad de la mutante *skn7Δ* podría deberse a la incapacidad de la cepa para contender con el estrés oxidante producido como consecuencia del ERE. Como se mencionó anteriormente, existe una codependencia entre Skn7p y Yap1p en la respuesta a ROS; por esta codependencia se infiere que si el papel de Skn7p en ERE está relacionado con la respuesta a ROS, el cofactor Yap1p sería también necesario para la respuesta a ERE. La mutante nula de *YAPI* está reportada como sensible a tunicamicina en ensayos a gran escala⁴⁶, sin embargo los resultados aquí mostrados no coinciden con ese reporte previo (**Figura 11**). Esta discrepancia quizá se deba a las altas concentraciones de inductores utilizadas en los estudios a gran escala, ya que usando concentraciones muy altas de tunicamicina (1.5μg/mL en adelante) se observó un fenotipo leve de sensibilidad en la mutante (resultados no mostrados), sin embargo estas concentraciones se consideran poco permisibles ya que comprometen incluso la viabilidad de la cepa silvestre.

Para descartar completamente que la función de Skn7p en ERE se relacione con la regulación de la respuesta a oxidantes, se evaluó la acumulación de ROS en la mutante *skn7Δ*. Se encontró, como está reportado, una acumulación modesta de ROS intracelulares al inducir ERE, sin embargo no se hallaron diferencias entre las curvas de fluorescencia de la cepa silvestre y de la mutante *skn7Δ*, descartando una acumulación letal de oxidantes en la mutante nula.

Interacción genética entre Skn7p y Crz1p

Los estudios realizados para estrés por ROS y de activación de Skn7p por *sln1** (la versión hiperactiva de Sln1p) sugieren que Skn7p requiere de un co-activador para iniciar sus funciones de regulación transcripcional^{26,36}. Aunado a esto, Skn7p se encuentra permanentemente localizada en el núcleo^{27,31}; debido a esta compartamentalización es necesario que la proteína co-activadora de Skn7p sea capaz de llevar la señal de activación del citoplasma hacia el núcleo. En el caso del estrés hiposmótico la activación se lleva a cabo por la Hpt del fosforrelevo^{26,27}. Sin embargo, en el presente trabajo se descartó la activación de Skn7p por la transferencia de fosfato al aspartato-427 para la respuesta a ERE, por lo que Ypd1p no resulta un candidato para transferir la señal a Skn7p. Debido a este resultado se evaluaron otros interactores de Skn7p reportados en la literatura. Una de estas interacciones es la de Skn7p con componentes de la vía de respuesta dependiente de calcio. El calcio almacenado en el RE es necesario para el correcto plegamiento de las

proteínas, efecto que se evidencia con la activación de la UPR cuando se utilizan quelantes para eliminar el calcio del organelo^{12,49}. La vía de señalización encargada de regular la señalización y la homeostasis del calcio es la vía de Calcineurina/Calmodulina. La supervivencia a ERE se encuentra afectada en mutantes nulas de genes de esta vía; de igual manera, la integridad de la ruta de señalización es necesaria para mantener la adecuada expresión de genes dependientes de Hac1p¹². El factor de transcripción maestro de esta vía, Crz1p, interacciona con Skn7p genética y físicamente; además, la interacción entre ambas proteínas no se pierde en una mutante *skn7*^{D427:N}. De manera importante, se sabe que Crz1p se localiza al núcleo tras ser activada en condiciones que promueven salida de calcio hacia el citoplasma. En conjunto, estos datos sugieren que Crz1p puede ser el co-activador de Skn7p.

En este trabajo se relacionó por primera vez a Crz1p con la respuesta a ERE inducido por tunicamicina. De manera relevante, el fenotipo de sensibilidad a tunicamicina de la mutante *crz1Δ* fue de igual intensidad que el fenotipo de Δ *skn7*, lo que sugiere una relación funcional entre ambas proteínas. Tras analizar con mayor detalle tal posibilidad, se observó que la doble mutante *crz1Δskn7Δ* presenta un fenotipo de letalidad sintética, lo cual es indicio de una fuerte interacción genética^{53,54} entre ambos factores de transcripción. Como se mencionó previamente, Crz1p se localiza en el núcleo cuando es activada, sin embargo, para sugerir la posibilidad de una interacción física entre Crz1p y Skn7p resultaba importante evaluar la localización de Crz1p en condiciones de ERE. Se encontró que Crz1p cambia su localización de citoplásmica a nuclear tras aproximadamente dos horas de estresar a las células con tunicamicina, la localización descrita para Skn7p, no cambia en estas condiciones (**Figura 16**). Al encontrarse en el mismo compartimento subcelular en condiciones de estrés, existe la posibilidad de que ambas proteínas interaccionen físicamente, no obstante es necesario demostrar la interacción con métodos específicos como el doble híbrido, FRET, o BFC. De igual manera sería de utilidad evaluar si la función de Skn7p y de Crz1p depende de otras proteínas de la vía de respuesta a calcio, y si depende del flujo intracelular de calcio. Se conoce que el calcio tiene un papel importante durante el estrés de retículo endoplásmico pero no se ha probado si el ERE provoca la salida de calcio del retículo o de la vacuola, eventos que podrían activar a Crz1p y explicar el cambio de localización que se observó en este trabajo. Por otra parte, si ambas proteínas interaccionaran físicamente, es muy probable que regulen a sus blancos transcripcionales de manera conjunta, por lo que

valdría la pena estudiar la expresión de genes dependientes de Skn7p y de Crz1p en condiciones de ERE y en las mutantes nulas estos factores.

Participación de otros genes de la vía de respuesta a calcio en el ERE

Se encontró que las mutantes *cnb1Δ* y *cna2Δ* copian el fenotipo de la mutante nula de *skn7Δ* en ERE inducido por 2-DOG, y que la mutante *cna2Δ* comparte el fenotipo de *crz1Δ* y *skn7Δ* en ERE inducido por tunicamicina. Estos resultados sugieren que las cuatro proteínas forman parte de la misma vía de señalización en la respuesta a ERE, sin embargo, para confirmar esto sería necesario construir las dobles mutantes *cnb1Δskn7Δ* y *cna2Δskn7Δ*, y evaluar su fenotipo. La participación de Calcineurina en el ERE coincide con la sensibilidad de la mutante nula de *CRZ1*, así como con la translocación al núcleo de esta proteína, ya que Crz1p requiere ser desfosforilada por Calcineurina para activarse.

Modelo final

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un escenario donde el ERE inducido por tunicamicina ocasiona salida de calcio del retículo endoplásmico. Este evento lleva a la activación de la vía de señalización por calcio, donde se activa de manera selectiva al complejo de Calcineurina que contiene a la subunidad catalítica Cna2p, dejando en aparente desuso para el ERE al complejo que contiene a la subunidad Cna1p. El complejo Cna2p-Cnb1p fomentaría la activación del factor de transcripción dependiente de calcio Crz1p, que termina por cambiar su localización del RE al núcleo; en este último compartimento, es probable que Crz1p y Skn7p interaccionen e induzcan la expresión de genes que permitan recuperar la homeostasis del retículo endoplásmico (**Figura 17**).

Este modelo es plenamente especulativo, sin embargo, dados los datos reportados en la literatura es el escenario más probable; para probarlo, se requieren varios experimentos que sirven también como perspectivas de este trabajo:

- Medir el flujo de calcio del RE al citosol en condiciones de ERE inducido por tunicamicina.
- Evaluar si el cambio de localización de Crz1p en condiciones de ERE depende de la presencia del complejo Cna2p-Cnb1p y al mismo tiempo, si este fenómeno requiere de la actividad de fosfatasa del complejo.
- Determinar si Crz1p y Skn7p interaccionan físicamente en el núcleo en condiciones de ERE.

- Evaluar la activación transcripcional de genes reporteros de Crz1p en condiciones de ERE, y estudiar si su activación depende de la presencia de Skn7p.

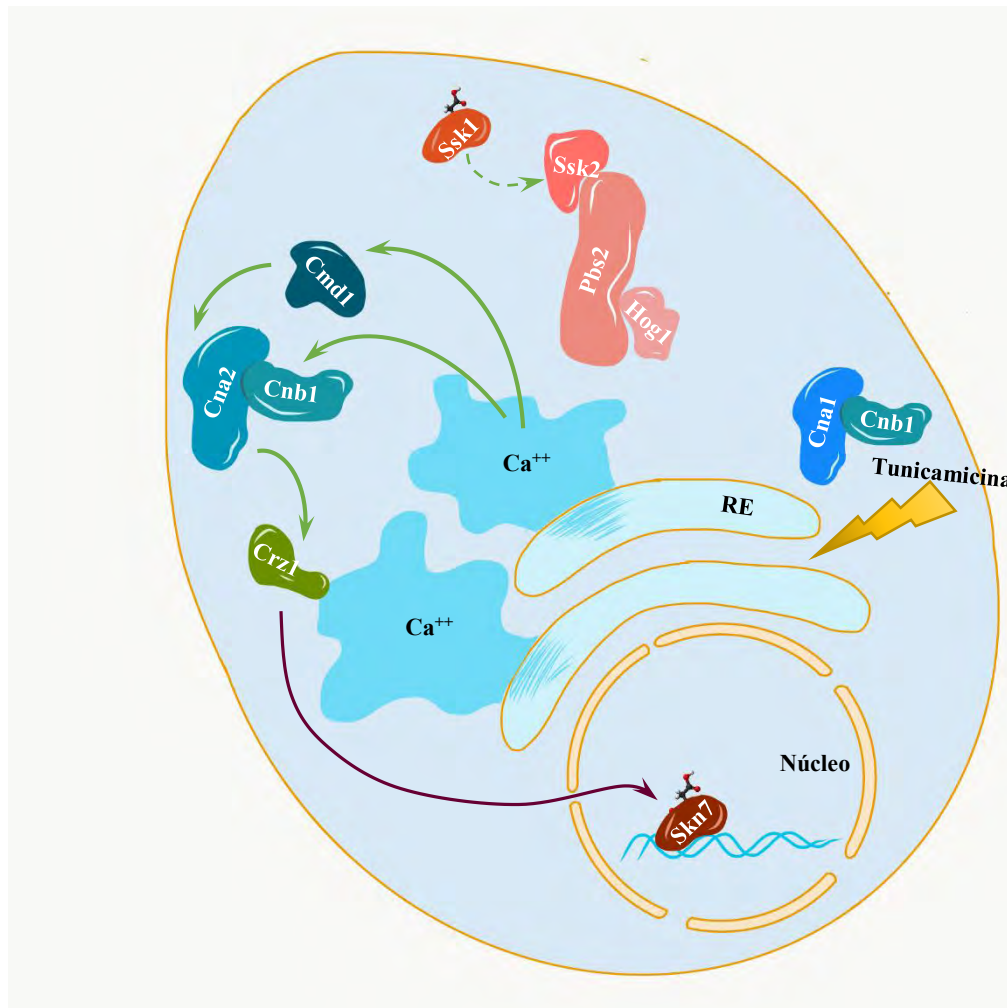


Figura 17. Modelo esquemático del mecanismo molecular posible de funcionamiento de los reguladores de respuesta en condiciones de ERE. El estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina podría inducir fugas de calcio del RE hacia el citosol; el calcio liberado del RE se asociaría con Calmodulina (Cmd1) y con la subunidad reguladora de Calcineurina (Cnb1), la unión del calcio a estas proteínas provocaría la activación de la subunidad catalítica de Calcineurina (Cna2). En su estado activado, Calcineurina activaría al factor de transcripción dependiente de calcio Crz1, quien finalmente se transloca del citosol al núcleo, donde posiblemente interacciona con Skn7 para promover la transcripción de genes que reestablezcan la homeostasis del RE. De manera independiente, el regulador de respuesta Ssk1 actúa señalizando por un mecanismo desconocido que no requiere el fosforrelevo, y que podría estar relacionado con el bloqueo de MAPKs de la vía de HOG.

Conclusiones

- El regulador de respuesta Skn7p es necesario para la supervivencia a ERE inducido por 2-DOG y tunicamicina.
- Skn7p y Hog1p se encuentran en vías de señalización separadas para la respuesta a ERE inducido por tunicamicina.
- Los reguladores de respuesta Ssk1p y Skn7p no se encuentran en la misma vía de señalización para la respuesta a ERE inducido por tunicamicina.
- Skn7p no requiere del aspartato aceptor del fosforrelevo (D-427) para responder a ERE inducido por tunicamicina o 2-DOG.
- Ssk1p no requiere del aspartato aceptor del fosforrelevo (D-554) para responder a ERE inducido por tunicamicina.
- El factor de transcripción regulado por ROS, Yap1p, no se requiere para la supervivencia a ERE inducido por 2-DOG o tunicamicina.
- La célula acumula ROS a causa del ERE inducido por 2-DOG o tunicamicina.
- El defecto de crecimiento de la mutante *skn7Δ* no se debe a una acumulación anormal de ROS.
- El factor de transcripción dependiente de calcio, Crz1p, es necesario para la supervivencia a ERE inducido por tunicamicina.
- El fenotipo de letalidad sintética de mutante doble *crz1Δskn7Δ* sugiere una fuerte interacción genética entre Skn7p y Crz1p.
- La fosfatasa dependiente de calcio, Calcineurina, es necesaria para la supervivencia a ERE inducido por 2-DOG y tunicamicina.
- De los dos genes parálogos que pueden codificar la subunidad catalítica de Calcineurina, sólo *CNA2* participa en la respuesta a ERE inducido por 2-DOG y tunicamicina.
- Crz1p se localiza al núcleo en condiciones de ERE inducido por tunicamicina.
- Crz1p y Skn7p se localizan en el mismo compartimento celular en condiciones de ERE inducido por tunicamicina.

Materiales y métodos

Cepas utilizadas

Todas las mutantes sencillas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de una colección comercial de mutantes en posesión del Dr. Gabriel del Río Guerra, quien amablemente las donó a nuestro laboratorio.

Cepa	Marcadores
BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
hog1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
ssk1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
skn7Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
crz1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
cnb1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
cna1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
cna2Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
skn7Δhog1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0
ssk1Δhog1Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0
hog1Δskn7Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0
crz1Δskn7Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0
CRZ1-GFP	MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 CRZ1-GFP:: <i>HIS3</i>
SKN7-GFP	MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 CRZ1-GFP:: <i>HIS3</i>

Medio y condiciones de cultivo

Para los ensayos de sensibilidad, las células de levadura fueron crecidas a 30°C en medio YPD líquido (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, y 2% de glucosa).

Ensayo de sensibilidad por goteo

A partir de cultivos en fase exponencial tardía se realizaron diluciones iniciales con densidad óptica (OD) a 600nm ajustada a 0.8. Se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 a partir de la dilución inicial (OD⁶⁰⁰=0.8). Las diluciones seriadas se gotearon de

mayor a menor concentración; se dejaron caer gotas de 3.5µL de volumen sobre cajas de Petri con medio de cultivo sólido con los respectivos inductores de estrés de retículo endoplásmico. El crecimiento se evaluó después de dos días de incubación a 30°C.

Inducción de la expresión de genes clonados en el plásmido pYES2.

Para inducir una expresión controlada de genes bajo el promotor pGAL1 en el plásmido pYES2 se obtuvieron cultivos en medio líquido sin galactosa (YPD) en fase exponencial tardía, las células fueron recuperadas por centrifugación y lavadas con agua destilada estéril para remover completamente el medio. Posteriormente fueron resuspendidas en medio con galactosa (YPGal) e incubadas a 30°C durante 30 minutos. Tras la incubación se recuperó a las células por centrifugación y se dieron dos lavados con agua destilada estéril. Finalmente, se resuspendió a las células en medio mínimo para su posterior uso en ensayos de sensibilidad por goteo.

Curvas de crecimiento.

A partir de cultivos en fase exponencial tardía se realizaron diluciones en medio líquido a $OD^{600}=0.05$. Los tratamientos se aplicaron sobre estas diluciones. En placas de lectura de 96 pozos se depositaron 200µL de cultivo en cada pozo; se realizó una réplica técnica en cada experimento. Las placas fueron leídas durante 24 horas en el lector automatizado Bioscreen C.

Purificación de DNA genómico de levadura

El DNA genómico se purificó con fenol cloroformo; brevemente: se obtuvieron cultivos saturados en medio líquido. Se colectaron las células y se lavaron con agua destilada estéril. Se realizó la lisis celular con buffer QTP (0.2% TritonX-100, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8 y 1mM Na₂EDTA), perlas de vidrio estériles, y fenol:cloroformo 1:1. Se agitaron las células en vórtex durante ~4min y posteriormente se añadieron 200µL de agua estéril. Se centrifugó y se colectó la fase acuosa del sobrenadante, misma que se resuspendió en etanol frío al 100%. Se centrifugó y el pellet se resuspendió en agua destilada estéril con RNasa A; se incubó a 37°C durante 5min. Se añadieron 10µL de acetato de amonio 4M y 1mL de etanol frío al 100%. Se centrifugó y se dejó secar el pellet, finalmente se resuspendió el pellet en agua estéril.

Purificación de DNA plasmídico de bacterias

Todos los plásmidos utilizados fueron purificados con el kit QIAprep de la compañía QIAGEN.

Purificación de DNA a partir de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados con los kits QIAquick y Gene Clean 2. Todos los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. En los casos en los que se obtuvo un solo producto, la solución se purificó directamente. Si se obtuvieron múltiples bandas, se cortó la banda correspondiente al peso molecular esperado y se purificó con los mismos kits (con las modificaciones pertinentes a los protocolos).

Transformación genética de bacterias

Bacterias competentes de la cepa de DH5 α de *Escherichia coli* fueron utilizadas para amplificar los plásmidos con las distintas construcciones utilizadas a lo largo de este trabajo. Se tomaron 100 μ L de cultivos ajustados a OD⁶⁰⁰=0.5 y se mezclaron con ~20ng de DNA. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos y se sometió a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Tras el choque térmico se incubó a las células en hielo por dos minutos. Se agregó 1mL de medio de cultivo a la suspensión, y se incubó en agitación (400rpm) a 37°C durante una hora. Se recuperaron las células por centrifugación; el pellet se resuspendió en ~100 μ L de medio de cultivo y se plaqueó en cajas de Petri con medio de selección.

Transformación genética de levaduras

A partir de cultivos en fase exponencial tardía se realizaron diluciones a una OD⁶⁰⁰=0.5 (volumen final mínimo de 10mL), se incubó a las células durante 3 horas a 30°C. Se recuperaron las células por centrifugación y se dio un lavado con agua destilada estéril. La suspensión celular se recuperó en un 1mL de agua destilada estéril, se centrifugaron las células y se dio un lavado con TE/LiOAc (Tris-EDTA-Acetato de Litio). Las células fueron resuspendidas en TE/LiOAc para obtener una suspensión de un décimo del volumen inicial de cultivo. Se tomaron 50 μ L de suspensión y se mezclaron con ~200ng de DNA circular o con ~1 μ g de DNA linear y con 300 μ L de PEG/LiOAc/TE (PEG 50%-Acetato de Litio-Tris-EDTA). La suspensión se incubó en agitación (400rpm) durante 30 minutos a 30°C. Se añadieron 40 μ L de DMSO y se dio un choque térmico a 42°C durante

15 minutos. Se recuperó a las células por centrifugación y se dio un lavado con agua destilada estéril; se resuspendió en 100µL y se plaqueó en cajas con medio selectivo.








Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5' – 3'
Skn7FWD*	AAGCTTCCTCTCTTTGTTTCCAT
Skn7RV*	GGATCCATAATCCTCCAAGATCA
Skn7[DA]FWD**	GGTTTAAATGGCCATTGTTATGC
Skn7[DA]RV**	GCATAACAATGGCCATTAAAACC

*Nucleótidos sombreados corresponden a sitios de restricción añadidos al primer.

**Nucleótidos sombreados corresponden al sitio en el que se realizó la sustitución de GAC por GCC.

Construcciones genéticas

Nombre	Esquema	Elaboración
pYES2-SKN7		Se amplificó el gen <i>SKN7</i> a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos: Skn7FWD y Skn7RV. El producto de PCR se clonó en el vector pYES2 utilizando los sitios BamHI y HindIII.
pYES2-SSK1		Construcción donada por Uriel Cruz y Laura Kawasaki.
crz1-GFP		Construcción integrada en el DNA genómico, donada por el Dr. Alexander de Luna.
hog1::URA3		
skn7::URA3		Se obtuvo URA3 del plásmido YEp352 con las enzimas HpaI y NarI y se insertó en el gen <i>SKN7</i> procesado con las enzimas EcoRV y SfuI.
pYES2-skn7 ^{D427:A}		Se reemplazó el codón GAC de las posiciones 1279-1281 por el codón GCC utilizando un oligonucleótido mutagénico.
pYES2-ssk1 ^{D554:A}		Construcción realizada por Uriel Cruz y Laura Kawasaki. Se sustituyó por mutagénesis sitio dirigida el codón GAC de las posiciones 1659-1662 por el codón GCC.

Construcción de skn7^{D427:A}

El protocolo consistió de tres PCRs. En la primera PCR (PCR1) se utilizó como templado la construcción pYES2-SKN7 y se utilizaron los oligonucleótidos Skn7RV y Skn7[DA]FWD. Se realizaron 30 ciclos en la reacción. Se purificó el producto de PCR (695pb). En una segunda PCR (PCR2) se utilizó como templado la construcción pYES2-SKN7 y se añadieron como oligonucleótidos el producto purificado de la PCR1 (~2µL) y el oligonucleótido Skn7FWD (~20ng). Se realizaron 10 ciclos en la reacción. El producto no purificado de la PCR2 se utilizó como templado en una tercera PCR (PCR3) junto con los oligonucleótidos Skn7FWD y Skn7RV. Se realizaron 40 ciclos en la reacción. El producto de la PCR3 se purificó y se clonó en el vector pYES2 con los sitios de restricción BamHI y HindIII. El vector con la construcción fue secuenciado y se revisó la secuencia

para confirmar la inserción de la mutación deseada y la integridad del resto de la secuencia.

Ensayo de acumulación de ROS por oxidación de H₂DCFDA

Se obtuvieron cultivos en medio líquido a una OD⁶⁰⁰ 0.2, se aplicaron los siguientes tratamientos: 1µg/mL de tunicamicina, DMSO (control negativo), y 3.5mM de 2-DOG. Se incubó a las células con los inductores durante dos, tres y cuatro horas. Pasado el tiempo de tratamiento se recolectaron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en PBS. Se incubó a las células con H₂DCFDA (Ex/Em: 492–495/517–527nm) a una concentración 10µM durante 30 minutos a 30°C en oscuridad, y posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo.

Citometría de flujo.

Las muestras analizadas por citometría de flujo fueron procesadas en un equipo Attune con láseres Azul/Violeta (405/488nm). En todos los casos se colectaron 50 000 células singletes y los datos fueron analizados con el software *Attune Cytometric Software v2.1*. Se colocaron dos ventanas (R1 y R2) en los histogramas de conteos contra fluorescencia, en las que se separó a las dos poblaciones observadas en los distintos ensayos. Para cada una de estas ventanas, se obtuvieron los parámetros de Media de Intensidad de Fluorescencia, Mediana de Intensidad de Fluorescencia y porcentaje de células. (**Ver Anexo II**)

Ensayo de localización de crz1-GFP.

Para estudiar la localización de Crz1p se utilizaron las cepas *CRZ1-GFP* y *SKN7-GFP* (donada por el Dr. Alexander de Luna, LANGEBIO) que poseen el gen de la proteína verde fluorescente fusionado en fase al marco de lectura abierto de los genes *CRZ1* y *SKN7*, respectivamente.

Se obtuvieron cultivos en medio líquido a una OD⁶⁰⁰ 0.2, se aplicaron los siguientes tratamientos: 1 µg/mL de tunicamicina, DMSO (control negativo) y 200mM Ca₂Cl. En el caso del estrés inducido por calcio, las células se incubaron durante 20 minutos, como está reportado. Para el estrés inducido por tunicamicina las células fueron incubadas durante 30 minutos, una hora, 1h 30min y dos horas. Al finalizar cada tratamiento las células fueron fijadas con formaldehído a una concentración final del 4% durante 20 minutos. Tras la fijación se lavaron las células con PBS y se tiñeron con 1 µg/mL DAPI (solución en PBS) durante 10 minutos, tras lo que se dio un lavado con PBS y las células se resuspendieron en 1mL. Se tomaron 250 µL de esta solución y se colectó a las células por centrifugación. El pellet fue resuspendido en 10 µL de PBS para obtener ~5x10⁵ células, esta solución se depositó sobre un portaobjetos previamente tratado con 1mg/mL de poli-L-lisina, y se almacenó en frío hasta el momento de su observación en el microscopio.

Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51. Se utilizaron los filtros verde y azul. Las micrografías fueron capturadas con un aumento total de 1,500X y tiempos de exposición de 150ms para DAPI y 2s para GFP. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas con el software de dominio público Fiji.

Referencias

1. Ghaemmaghami, S. *et al.* Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741 (2003).
2. Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957 (2008).
3. Pittman, J. K. Vacuolar Ca²⁺ uptake. *Cell Calcium* **50**, 139–146 (2011).
4. Cui, J., Kaandorp, J. A., Sloot, P. M. A., Lloyd, C. M. & Filatov, M. V. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1137–1147 (2009).
5. D’hooge, P. *et al.* Ca²⁺ homeostasis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Impact of ER/Golgi Ca²⁺ storage. *Cell Calcium* **58**, 226–235 (2015).
6. Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 79–94 (2016).
7. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
8. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2012). doi:10.1038/nrm3270
9. Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455–62 (2008).
10. Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F. & Prieto, J. A. The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J. Biol. Chem.* **285**, 20088–96 (2010).

11. Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K. L. & Krysan, D. J. The Unfolded Protein Response Is Induced by the Cell Wall Integrity Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascade and Is Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **20**, 164–175 (2009).
12. Bonilla, M. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* **21**, 2343–2353 (2002).
13. Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science (80-.)*. **333**, 1891–1894 (2011).
14. Back, S. H., Schröder, M., Lee, K., Zhang, K. & Kaufman, R. J. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* **35**, 395–416 (2005).
15. Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites. *J. Biol. Chem.* **273**, 1802–7 (1998).
16. Maeda, T., Takekawa, M. & Saito, H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**, 554–8 (1995).
17. Posas, F. *et al.* Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **86**, 865–75 (1996).
18. O’Rourke, S. M., Herskowitz, I. & O’Shea, E. K. Yeast go the whole HOG for

- the hyperosmotic response. *Trends Genet.* **18**, 405–12 (2002).
19. Saito, H. & Posas, F. Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics* **192**, 289–318 (2012).
 20. Hohmann, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* **61**, 373–82 (2015).
 21. Capra, E. J. & Laub, M. T. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 325–347 (2012).
 22. Saito, H. Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem. Rev.* **101**, 2497–509 (2001).
 23. Zschiedrich, C. P., Keidel, V. & Szurmant, H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J. Mol. Biol.* **428**, 3752–3775 (2016).
 24. Santos, J. L. & Shiozaki, K. Fungal Histidine Kinases. *Sci. Signal.* **2001**, re1-re1 (2001).
 25. Morgan, B. A., Bouquin, N., Merrill, G. F. & Johnston, L. H. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J.* **14**, 5679–89 (1995).
 26. Li, S. The Eukaryotic Two-Component Histidine Kinase Sln1p Regulates OCH1 via the Transcription Factor, Skn7p. *Mol. Biol. Cell* **13**, 412–424 (2002).
 27. Lu, J. M.-Y., Deschenes, R. J. & Fassler, J. S. *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot. Cell* **2**, 1304–14 (2003).

28. Reiser, V., Raitt, D. C. & Saito, H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* **161**, 1035–40 (2003).
29. Ota, I. M. & Varshavsky, A. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**, 566–9 (1993).
30. Brown, J. L., North, S. & Bussey, H. SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J. Bacteriol.* **175**, 6908–15 (1993).
31. Brown, J. L., Bussey, H. & Stewart, R. C. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* **13**, 5186–94 (1994).
32. Williams, K. E. & Cyert, M. S. The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *EMBO J.* **20**, 3473–83 (2001).
33. Brown, J. L., Bussey, H. & Stewart, R. C. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* **13**, 5186–94 (1994).
34. Morgan, B. A. *et al.* The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 1035–1044 (1997).
35. He, X.-J., Mulford, K. E. & Fassler, J. S. Oxidative Stress Function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 Receiver Domain. *Eukaryot. Cell* **8**, 768–778 (2009).
36. Mulford, K. E. & Fassler, J. S. Association of the Skn7 and Yap1 Transcription

- Factors in the *Saccharomyces cerevisiae* Oxidative Stress Response. *Eukaryot. Cell* **10**, 761–769 (2011).
37. Krems, B., Charizanis, C. & Entian, K. D. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr. Genet.* **29**, 327–34 (1996).
 38. Lu, J. M.-Y., Deschenes, R. J. & Fassler, J. S. Role for the Ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction. *Eukaryot. Cell* **3**, 1544–56 (2004).
 39. Hanlon, S. E., Rizzo, J. M., Tatomer, D. C., Lieb, J. D. & Buck, M. J. The Stress Response Factors Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 Direct Targeting of the Conserved Co-Repressor Tup1-Ssn6 in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **6**, e19060 (2011).
 40. Lenssen, E., Azzouz, N., Michel, A., Landrieux, E. & Collart, M. A. The Ccr4-Not Complex Regulates Skn7 through Srb10 Kinase. *Eukaryot. Cell* **6**, 2251–2259 (2007).
 41. Thewes, S. Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot. Cell* **13**, 694–705 (2014).
 42. Rusnak, F. & Mertz, P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483–521 (2000).
 43. Yoshimoto, H. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 31079–88 (2002).
 44. Polizotto, R. S. & Cyert, M. S. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J. Cell Biol.* **154**, 951–960 (2001).

45. Boustany, L. M. & Cyert, M. S. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* **16**, 608–619 (2002).
46. Parsons, A. B. *et al.* Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**, 62–69 (2004).
47. Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A. & Voeltz, G. K. Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 791–811 (2015).
48. Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science (80-.).* **333**, (2011).
49. Bonilla, M. & Cunningham, K. W. Mitogen-activated Protein Kinase Stimulation of Ca²⁺ Signaling Is Required for Survival of Endoplasmic Reticulum Stress in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4296–4305 (2003).
50. Levin, D. E. Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175 (2011).
51. Tu, B. P. & Weissman, J. S. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* **10**, 983–94 (2002).
52. Tu, B. P. & Weissman, J. S. Oxidative protein folding in eukaryotes: Figure 1. *J. Cell Biol.* **164**, 341–346 (2004).
53. Nijman, S. M. B. Synthetic lethality: General principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett.* **585**, 1–6 (2011).

54. Kuzmin, E., Costanzo, M., Andrews, B. & Boone, C. Synthetic Genetic Arrays: Automation of Yeast Genetics. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, pdb.top086652 (2016).

Anexo I

Abreviaturas utilizadas

β -Me: β -Mercaptoetanol

CC: *Coiled-Coil*.

CDRE: Elemento de Respuesta Dependiente de Calcineurina.

D-: aspartato-

DBD: Dominio de Unión con DNA

DMSO: dimetilsulfóxido.

2-DOG: 2-desoxy-D-glucosa.

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

GFP: Proteína Verde Fluorescente.

H-: Histidina-

HK: Histidina Cinasa

Hpt: Histidina fosfotransferasa

KDa: Kilodaltones

MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos.

OD: Densidad Óptica.

pb: pares de bases

PEG: polietilenglicol.

REC: Receptor

REDOX: Óxido-Reducción

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

t-BOOH: *ter*-butil hidroperóxido

Tm: tunicamicina.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

WT: cepa silvestre.

Anexo II

