



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Participación de la Vía de Calcio Intracelular durante el  
estrés de retículo endoplásmico en la levadura *Saccharomyces  
cerevisiae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Abiram Eliab Olivares Resendiz

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dr. Roberto Coria Ortega

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

Dra. Adela Rodríguez

Instituto de Química, UNAM

Dr. Luis Vaca

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Agosto, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

A los sinodales que evaluaron este trabajo:

- Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
- Dr. Francisco Torres Quiróz
- Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro
- Dr. José Adolfo García Sáinz
- Dr. Jesús Aguirre Linares

Por la ayuda técnica:

- Dra. Laura Kawasaki Watanabe
- Dra. Ma. Teresa Lara Ortíz
- Dr. Abraham Rosas Arellano

Al personal de la Unidad de Biología Molecular del IFC:

- Dra. Laura Ongay Larios
- Biol. Guadalupe Codiz Huerta
- M. en C. Minerva Mora Cabrera

Al personal de la Unidad de Cómputo del IFC:

- Biol. Gerardo Coello Coutiño
- M. en C. Ana María Escalante Monsalvo
- Ing. Juan Manuel Barbosa

Al personal de la Unidad de Imagenología del IFC:

- Dr. Abraham Rosas Arellano
- Dra. Ruth Rincón Heredia

Al personal del Taller de Mantenimiento del IFC:

- Ing. Manuel Ortíz Benavides
- Ing. Aurey Galván Lobato

Al personal del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT)

CONACyT: Proyecto CB-254078.

PAPIIT, DGAPA, UNAM: Proyecto: IN210519.

PAEP, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

CONACyT por beca otorgada, becario No: 632585

# Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
Introducción.....	5-14
1. <b>Estrés de retículo endoplásmico en levaduras</b> .....	5-7
1.1 Estrés de retículo endoplásmico.....	5
1.2 Inductores de estrés de retículo endoplásmico.....	6-7
2. <b>Calcio y retículo endoplásmico</b> .....	7-14
2.1 Señalización mediada por calcio .....	7-8
2.2 Funciones del calcio en la homeostasis del retículo endoplásmico.....	8-9
2.3 Vía de Calcio Intracelular en <i>S. cerevisiae</i> .....	9-10
2.4 Componentes proteicos relevantes en la regulación del calcio en <i>S. cerevisiae</i> .....	10-14
2.4.1 Sistemas de movilización de calcio.....	10-11
2.4.2 Cinasas y fosfatasas.....	11-12
2.4.3 Factores de transcripción.....	13-14
Planteamiento del problema e hipótesis.....	15
Resultados.....	16-29
• <b>Cnb1p tiene un papel esencial en la supervivencia a ERE</b> .....	16
• <b>Skn7p y Calcineurina se encuentran en vías de señalización paralelas en ERE</b> .....	16-17
• <b>Crz1p activa la transcripción en respuesta a ERE</b> .....	18-19
• <b>Cnb1p se requiere para la activación de Crz1p</b> .....	20
• <b>El indicador B-GECO permite seguir la dinámica del calcio en <i>S. cerevisiae</i></b> .....	21-22
• <b>El calcio citosólico incrementa progresivamente durante el ERE</b> .....	22-23
• <b>Crz1-Venus no se localiza al núcleo si se secuestra el calcio externo</b> .....	24
Discusión.....	25-30
Conclusiones.....	31
Materiales y métodos.....	32-38
Anexo I.....	39-40
Anexo II.....	41
Anexo III .....	42
Anexo IV.....	43
Referencias.....	44-51

## Resumen

En células animales, la homeostasis del calcio está estrechamente relacionada con el adecuado funcionamiento del retículo endoplásmico (RE). De manera específica, en el lumen del RE se requieren concentraciones de calcio elevadas y rigurosamente controladas para que se lleve a cabo el plegamiento, la degradación, y el transporte de las proteínas en el organelo. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la relación entre el calcio y el RE es dudosa: aunque el calcio no parece ser necesario para el plegamiento de las proteínas, el ion se encuentra en concentraciones elevadas en el retículo endoplásmico y se ha reportado que eliminarlo de la célula genera estrés en el organelo.

En este trabajo se indagó en la relación del calcio con la homeostasis del RE en *S. cerevisiae*, para lo cual se estudió la Vía de Calcio Intracelular en condiciones de estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina (ERE). Se encontró que la supervivencia de la célula al ERE disminuye si se eliminan los reguladores maestros de la vía: la fosfatasa Calcineurina y el factor de transcripción Crz1p. Además, se encontró que en respuesta al ERE inducido por tunicamicina, Crz1p cambia su localización de citosólica a nuclear y activa la expresión genética. Estos cambios son mediados por la fosfatasa Calcineurina y se abaten si se secuestra el calcio externo con el uso de quelantes. Finalmente, se adaptó el sensor de calcio BGECO para su uso en *S. cerevisiae* y se demostró su utilidad para monitorear flujos de calcio inducidos por  $\text{CaCl}_2$  y tunicamicina. Los defectos de crecimiento observados en las mutantes de la Vía de Calcio Intracelular en condiciones de ERE, sumados a la activación de la vía tras la inducción con tunicamicina, revelan una relación bidireccional: por un lado, la pérdida de la proteostasis del RE altera la homeostasis del calcio, y, por otro lado, la falta de regulación del calcio intracelular impide que una célula en ERE recupere la proteostasis en el organelo.

## **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 eucariontes<sup>1,2</sup>. Este organelo es además el sitio principal de almacenaje de calcio en las células de mamífero y el segundo más importante en las células de levadura (en este caso el principal reservorio es la vacuola)<sup>3-5</sup>. Debido a la importancia de estas dos funciones, mantener la homeostasis del RE es vital para la supervivencia de las células eucariontes.

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<sup>1,2,6</sup>. 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 en la capacidad de síntesis proteica del organelo. Al suscitarse dicho estrés, se desencadenan distintos eventos de señalización celular con el objetivo de restablecer 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)<sup>1,2</sup>.

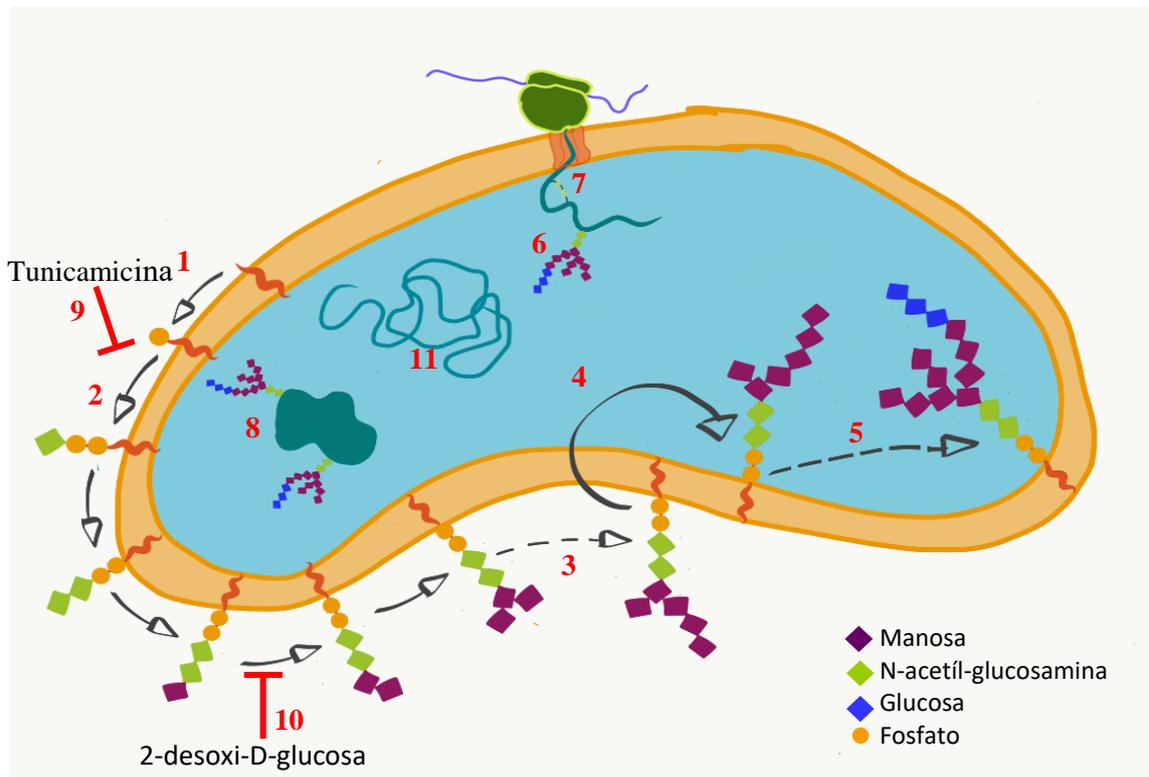
Los principales componentes de la UPR tanto en mamíferos, como en plantas y en hongos han sido descritos a lo largo de los años. Sin embargo, también se han identificado varias proteínas cuya función afecta la respuesta a estrés de retículo endoplásmico pero que se encuentran en vías de señalización paralelas a la UPR<sup>2,7</sup>. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, algunas de las vías de señalización necesarias para sobrevivir al ERE son la vía de respuesta a osmolitos (vía de HOG) y la vía de integridad de pared celular<sup>7,8</sup>.

#### *1.2 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, lo que causa 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  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -me). Por otro lado, los agentes que afectan la glicosilación de proteínas ejercen su función al impedir la síntesis del polisacárido que se transfiere a las proteínas naciates en el RE; agentes de este tipo son la tunicamicina (Tm) y la 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG). La tunicamicina es un antibiótico que inhibe a la enzima Alg7p, la cual 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 hexosas e inhibe la síntesis del polisacárido, dejándolo trunco. Un polisacárido incompleto no puede incorporarse a las proteínas y detiene su procesamiento (**Figura 1**).

El uso de inductores de ERE que inhiben la glicosilación de proteínas es preferible debido a que afectan de manera más específica el plegamiento de proteínas. A diferencia de los agentes que impiden la glicosilación, los agentes reductores tienen efectos pleiotrópicos, como la alteración del estado REDOX. El desequilibrio del estado REDOX induce otros tipos de estrés y conlleva a la activación de otras vías de respuesta celular que pueden enmascarar los efectos del ERE.



**Figura 1. 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 ditiotreitól o el  $\beta$ -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.

## 2. Calcio y retículo endoplásmico

### 2.1 Señalización mediada por calcio

El ion  $\text{Ca}^{++}$  es un segundo mensajero de gran importancia en las células eucariontes. La señalización mediada por calcio cumple distintas funciones y está conservada en todos los organismos estudiados a la fecha<sup>3,5</sup>. El calcio intracelular se halla secuestrado en los distintos organelos, sin embargo, el RE es el mayor reservorio en mamíferos y la vacuola lo es en levaduras. Esta compartimentalización del calcio permite que la concentración

citósica del ion sea de uno a dos órdenes de magnitud menor que en el medio externo<sup>3,4</sup>. Distintos estímulos pueden ocasionar la expulsión del calcio de los compartimentos celulares, provocando un incremento súbito en la concentración del catión en el citosol. El aumento en la concentración citósica de calcio es detectado por la proteína Calmodulina. La Calmodulina es una proteína con dominios de unión de Calcio que está conservada en todos los eucariontes y es esencial para la señalización mediada por calcio. En su forma activa (asociada a calcio), la Calmodulina interacciona con la fosfatasa Calcineurina y la activa. La Calcineurina tiene distintas proteínas blanco, las más importantes son los factores de transcripción dependientes de calcio ya que estos regulan gran parte de la respuesta inducida por la expulsión de calcio, así como el restablecimiento de la concentración citósica e intraorganelar del catión<sup>3,9</sup>.

## *2.2 Funciones del calcio en la homeostasis del retículo endoplásmico.*

El retículo endoplásmico es el principal reservorio de calcio en metazoarios y el segundo más importante en levaduras<sup>4,10,11</sup>. Existen diversos mecanismos para garantizar el resguardo del ion dentro del RE, lo que tiene como consecuencia que su concentración se mantenga alta en el organelo y baja en el citoplasma.

El control preciso de la segregación del calcio en el RE, sugiere que el dicatión cumple funciones vitales para el funcionamiento del organelo secretor; tal es el caso en células animales, donde se han reportado funciones de gran importancia para el plegamiento de proteínas. Aunque la concentración total de calcio al interior del RE es de 1 a 2 mM, la concentración de calcio libre es tan sólo de 50 a 500  $\mu\text{M}$ <sup>12,13</sup>. Esta discordancia se explica porque gran parte del calcio del organelo se encuentra unido a chaperonas<sup>14</sup>. La unión del calcio en el RE se encuentra dominada por unas cuantas proteínas, tan sólo el par calreticulina-BiP es capaz de unir 75% del calcio del organelo<sup>12,15,16</sup>; otras chaperonas residentes del RE como Grp94 y la familia de las PDIs también cuentan con sitios de unión a calcio<sup>12,15</sup>. En todas las chaperonas mencionadas, el calcio cumple un papel elemental en los ciclos de catálisis y su deficiencia puede generar defectos en la capacidad de plegamiento del RE<sup>15,17</sup>. Un ejemplo claro de la importancia del calcio en la homeostasis del RE, es su papel en el ciclo catalítico de las chaperonas de proteínas glicosiladas, calreticulina y calnexina, cuya unión a los árboles de glicosilación depende de la presencia de altas concentraciones de calcio en el medio

circundante<sup>13,18</sup>. Igual de relevante es que la chaperona BiP, un sensor de la UPR, sea responsable de la unión del 25% del calcio total del retículo<sup>12,16</sup>. Finalmente, también se conoce que alteraciones en el calcio del RE bloquean el tráfico de las proteínas de la vía secretora<sup>12,19</sup>.

Pese a la multitud de evidencias encontradas en células animales sobre la estrecha relación entre el calcio y la biología del RE, la misma conexión ha sido puesta en duda para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque en *S. cerevisiae* la distribución celular de las pozas de calcio es similar a la de las células animales, las concentraciones que tiene son significativamente diferentes. Por ejemplo, el retículo endoplásmico de la levadura almacena hasta cien veces menos que su equivalente en mamíferos<sup>20</sup> y a la fecha no se ha podido demostrar que la función de las chaperonas residentes de este organelo en levadura dependa de su asociación con calcio, aunque se trate de los ortólogos de BiP y calreticulina/calnexina<sup>14,21</sup>.

Si bien las chaperonas del RE de levaduras no requieren de calcio para funcionar adecuadamente, se ha reportado que la vía UPR se activa cuando se elimina el calcio de las células por medio de quelantes<sup>22</sup>. Así mismo en nuestro laboratorio se ha demostrado que algunas mutantes nulas de los genes de la vía de Calcio Intracelular muestran defectos de crecimiento cuando se induce estrés de RE con tunicamicina<sup>23</sup>. Estos antecedentes dejan abierta la posibilidad de que la homeostasis del RE dependa de un adecuado control del calcio intracelular.

### *2.3 Vía de Calcio Intracelular en Saccharomyces cerevisiae*

En levaduras, la Vía de Calcio intracelular se activa 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<sup>3,9</sup>. En la Vía de Calcio Intracelular de *S. cerevisiae*, el sensor de calcio más importante es 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 presente<sup>24</sup>. 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<sup>24,25</sup>. La homeostasis del calcio se recupera gracias a varios transportadores y ATPasas que retornan el calcio citosólico a los distintos organelos.

#### *2.4 Componentes proteicos relevantes en la regulación del calcio en S. cerevisiae*

Aunque la levadura *S. cerevisiae* mantiene las pozas de calcio observadas en metazoarios, la bibliografía indica que la biología del calcio en este organismo tiene marcadas diferencias con la de células animales. Como se ha mencionado anteriormente, el principal sitio de almacenamiento de calcio en la levadura es un organelo que no se encuentra en metazoarios: la vacuola; en la cual el calcio se encuentra asociado a fosfato inorgánico. Se sabe también que el RE de la levadura almacena varias decenas de veces menos calcio que el de metazoarios. Finalmente, varios de los sistemas de movilización de calcio presentes en animales, no se encuentran en levadura o no presentan la misma localización subcelular<sup>14</sup>. Más adelante se detallará aspectos importantes de estos sistemas.

##### *2.4.1 Sistemas de movilización de calcio*

Se puede dividir a las proteínas relacionadas a la movilización de calcio en levaduras en tres grandes grupos: canales iónicos de calcio localizados en membrana plasmática, bombas y transportadores organelares de calcio, y canales iónicos de calcio localizados en organelos.

En el primer grupo se encuentran los sistemas de internalización de calcio de alta y baja afinidad (HACS y LACS, respectivamente). El sistema HACS, conformado por las proteínas Cch1p, Mid1p y Ecm7p, y tiene homología con los canales de calcio regulados por voltaje de mamíferos<sup>14,26,27</sup>. Mientras que el segundo sistema, LACS, tiene homología con los canales ionotrópicos de glutamato de mamíferos<sup>14</sup>. Ambos sistemas permiten la internalización de grandes cantidades de calcio del medio extracelular en periodos breves de tiempo. De manera relevante, se conoce que su regulación es distinta y que son sistemas independientes: el canal HACS es regulado negativamente por acción directa de Calcineurina, mientras que el canal LACS no es afectado por esta proteína<sup>14,26-29</sup>.

El segundo grupo engloba a las ATPasas de Vía Secretora (SPCAs) y a una serie de transportadores de calcio. Estas proteínas se encargan de capturar el calcio libre en el citosol e internalizarlo en los organelos. Llama la atención que el transporte de calcio mediado por ATPasas en *S. cerevisiae* carezca de bombas de calcio tipo SERCA—responsable de la gran capacidad de almacenaje de calcio en el RE de animales—, en su lugar, las responsables de almacenar calcio en los organelos son las SPCAs Pmr1p y Pmc1p, que no poseen la misma capacidad de transporte que las SERCA y además no son específicas para calcio, sino que también transportan manganeso<sup>5,11,14</sup>. La regulación de estas bombas está dada, a nivel transcripcional, por la actividad de Calcineurina y Crz1p<sup>14,24,30</sup>. Se conoce poco sobre la regulación e importancia de los transportadores de calcio de levaduras, sin embargo, es relevante mencionar que el transportador Gdt1p, localizado en el aparato de Golgi, parece ser importante para la supervivencia al estrés de RE<sup>31</sup>.

Finalmente, la levadura *S. cerevisiae* destaca por no poseer homólogos de los canales de calcio del RE de animales, como son el receptor de IP3 y el receptor de Ryanodina—pese a que se presume que estos canales estaban presentes en el ancestro común de animales y hongos<sup>14</sup>. Estas pérdidas, sumadas a la concentración no tan alta de calcio en el RE de *S. cerevisiae*, ponen en duda la capacidad de este organelo para transducir señales a través del calcio, como hacen otros eucariontes. Además la vacuola, que es el organelo que concentra la mayor cantidad de calcio en *S. cerevisiae* sí posee un canal de calcio conocido como Yvc1p. Este canal es homólogo a los canales TRPC de metazoarios que generan corrientes de calcio hacia el citosol durante estrés osmótico y estrés oxidante<sup>14,32,33</sup>.

#### 2.4.2 Cinasas y fosfatasas

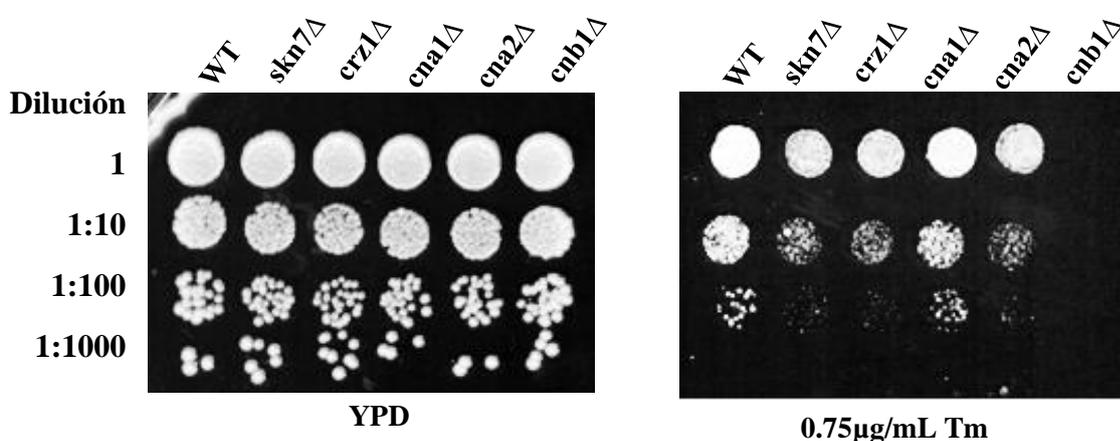
*S. cerevisiae* tiene ortólogos tanto del sensor Calmodulina, como de uno de sus efectores más importantes: la fosfatasa Calcineurina. Como se mencionó previamente, esta rama de señalización es central en la regulación del calcio en levaduras, y al igual que su símil en animales, es activada por un incremento en la concentración citosólica de calcio.

El blanco mejor descrito de Calcineurina es el factor de transcripción dependiente de calcio Crz1p, del que se hablará en futuras secciones; a través de este factor, la

Calcineurina regula indirectamente la abundancia de varios de los transportadores de calcio mencionados anteriormente, sin embargo, también se han reportado efectos directos (desfosforilación) de la fosfatasa sobre estos transportadores<sup>14,28</sup>.

Además de la bien conocida vía de Calmodulina/Calcineurina, la levadura tiene dos ortólogos de las cinasas dependientes de Calmodulina CaMK, *CMK1* y *CMK2*<sup>14,34</sup>; además de una familia de dos integrantes de reguladores negativos de Calcineurina, denominados RCN<sup>14</sup>. Lamentablemente todos estos reguladores han sido pobremente descritos y se desconoce su función precisa en la homeostasis de calcio en *S. cerevisiae*

De manera importante para este trabajo, se ha relacionado la actividad de Calcineurina con la supervivencia a estrés de retículo endoplásmico. Primero, se ha visto que al vaciar las pozas de calcio internas o al crecer las células en medios con baja concentración de calcio, se activa la UPR, y se observó también que una mutante triple de los genes *CNBI*, *CMK1*, y *CMK2*, tiene defectos de crecimiento en presencia de inductores de ERE<sup>22</sup>. Segundo, en nuestro laboratorio se encontró que mutantes nulas de las subunidad Cna2p de Calcineurina y del factor de transcripción Crz1p crecen deficientemente en medio con tunicamicina y se encontró también que una mutante de la subunidad reguladora, Cnb1p, es extremadamente sensible al antibiótico (**Figura 3**)<sup>23</sup>.



**Figura 3. Sensibilidad a inductores de ERE en mutantes nulas de la vía de respuesta a calcio.** Las subunidades *CNBI* y *CNA2* de Calcineurina, así como el factor de transcripción *CRZI* se requieren para la supervivencia a ERE inducido por tunicamicina. Tm: tunicamicina. YPD: medio rico. Dilución inicial: 0.08 OD<sup>600</sup>. Modificado de Olivares, 2017.

#### 2.4.3 Factores de transcripción

Dos factores de transcripción han sido asociados funcionalmente con la Vía de Calcio Intracelular en levaduras: Crz1p y Skn7p<sup>35,36</sup>.

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 funciones<sup>25</sup>. 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<sup>24,37</sup>.

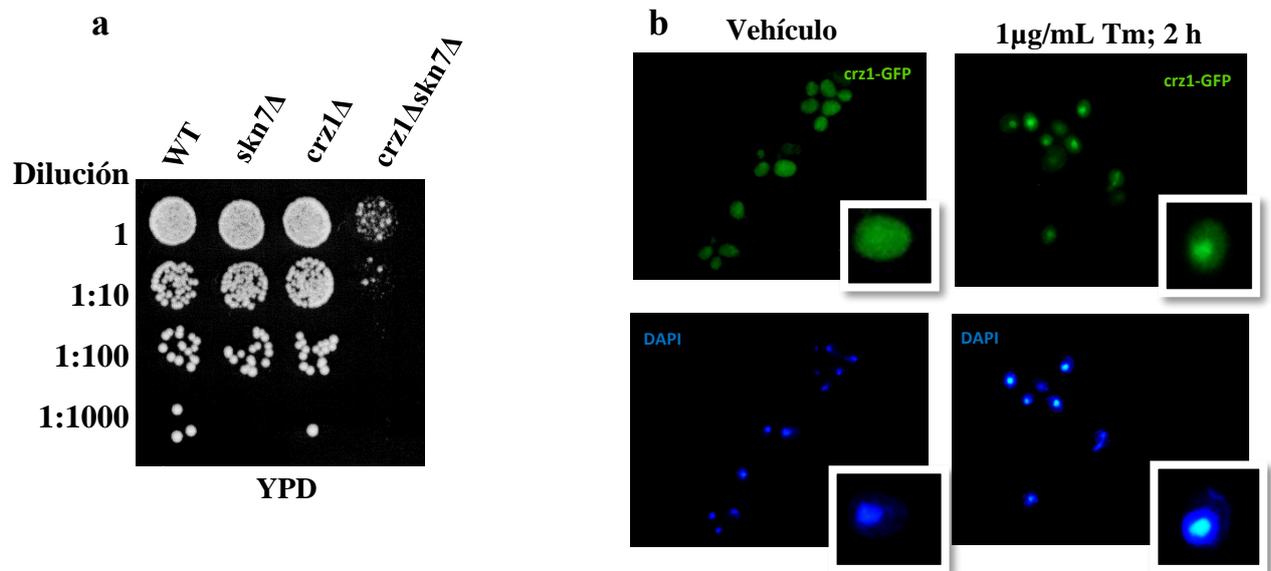
En condiciones normales Crz1p se localiza en el citoplasma de la célula. En éste compartimento, la proteína se encuentra hiperfosforilada. Cuando se activa la señalización por calcio, la Calcineurina desfosforila a Crz1p y ésta es transportada al núcleo por la actividad de la importina Nmd5p<sup>38</sup>. 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<sup>3,25,39</sup>. Cinasas aún no identificadas refosforilan a Crz1p en el núcleo, lo que favorece su exportación al citoplasma por medio de la exportina Msn5p<sup>40</sup>.

Skn7p, por su parte es una proteína nuclear de 622 aminoácidos; tiene tres dominios que regulan su función: un dominio de unión con DNA (DBD), un dominio de regulador de respuesta (REC), y un dominio *coiled coil* de interacción con proteínas (CC).

La función de Skn7p no está completamente clara. Originalmente se describió a Skn7p como uno de dos reguladores de respuesta del único sistema fosforrelevo de *S. cerevisiae*, y se le asoció con la biogénesis de la pared celular; sin embargo, estas primeras observaciones se realizaron en fondos genéticos alterados que no representan la fisiología natural de la célula de levadura<sup>41,42</sup>. Posteriormente, y con evidencias sólidas, Skn7p se identificó como uno de los dos reguladores maestros de la respuesta transcripcional a especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>43-46</sup>. Finalmente, en 2001 se reportó una relación entre Skn7p y la vía de Calcineurina/Crz1 en condiciones de estrés por calcio extracelular<sup>36</sup>. En este trabajo se indica que Skn7p sostiene una interacción física *in vitro* con Calcineurina y Crz1p, y que la expresión de *FKS2* disminuye significativamente en la mutante nula de *SKN7*<sup>36</sup>. Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que Skn7p más que ser un activador de *FKS2* parece ser un represor (Tesis de Maestría de Iris Hernández).

En nuestro grupo de trabajo se mostró que una mutante *skn7Δ* presenta un fenotipo de sensibilidad a inductores de estrés de RE, que no se relaciona con su participación en la vía del fosforrelevo o en la vía de respuesta a ROS. Adicionalmente, se encontró que

*CRZI* y *SKN7* tienen una fuerte interacción genética, ya que la doble mutante de estos factores presenta un fenotipo de letalidad sintética (**Figura 4a**). En el laboratorio se observó que Crz1p cambia su localización del citosol al núcleo tras estimular a las células con tunicamicina<sup>23</sup>, por lo que se generó como hipótesis que la Vía de Calcio Intracelular se activa en condiciones de estrés de RE, (**Figura 4b**)<sup>23</sup>.



**Figura 4. Crz1p participa en la respuesta a ERE.**  
**a)** La mutante *crz1Δskn7Δ* presenta fenotipo de letalidad sintética. **b)** *CRZI-GFP* cambia su localización en presencia de tunicamicina. Tm: tunicamicina. Modificado de Olivares, 2017. YPD: medio rico. Dilución inicial: 0.08 OD<sup>600</sup>.

## **Planteamiento del problema**

La homeostasis de calcio y el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE) son eventos co-dependientes en células animales; sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae* las evidencias de esta relación son contradictorias. Por un lado, a diferencia de sus equivalentes en animales, las chaperonas residentes del RE de *S. cerevisiae* no requieren calcio para efectuar sus funciones de plegamiento; por otro lado, la UPR de *S. cerevisiae* se activa en condiciones de agotamiento del calcio del RE, lo que sugiere que el calcio se requiere para los procesos de maduración y plegamiento de las proteínas nacientes.

En nuestro grupo de trabajo se encontró que la vía de Calcio Intracelular es necesaria para la supervivencia al estrés de retículo endoplásmico (ERE). Además, se encontró que el factor de transcripción Skn7p—recientemente asociado con la regulación de la vía de Calcio Intracelular—es también necesario para sobrevivir a ERE, y se planteó la co-regulación de la transcripción por la vía de Calcio Intracelular y Skn7p como un mecanismo importante de supervivencia a ERE. En el presente trabajo se buscó detallar en los mecanismos de la activación de esta vía en condiciones de ERE.

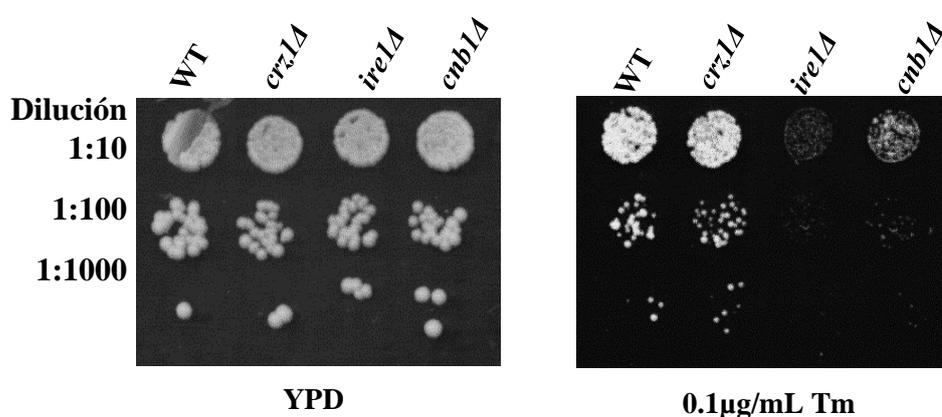
## **Hipótesis**

Un incremento en el calcio citosólico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* activa la vía de Calcio Intracelular durante el estrés de retículo endoplásmico y requiere de la actividad de los factores de transcripción Crz1 y Skn7p para mantener la supervivencia.

## Resultados

### *Cnb1p* tiene un papel esencial en la supervivencia a ERE

En un trabajo previo, se observó un fenotipo de sensibilidad a inductores de ERE en las mutantes de las subunidades de Calcineurina, *cna2Δ* y *cnb1Δ*<sup>23</sup>; el fenotipo de la mutante de la subunidad reguladora, *cnb1Δ*, fue de particular interés ya que resultó altamente sensible. Se decidió evaluar a fondo la intensidad de este fenotipo mediante ensayos de sensibilidad por goteo en concentraciones decrecientes de tunicamicina y se utilizó a la mutante nula del sensor Ire1p como referencia de uno de los fenotipos más severos que se conocen a estrés de retículo endoplásmico, así como la mutante *crz1Δ*, como referente de un fenotipo de sensibilidad moderada. Se realizaron pruebas en las siguientes concentraciones de tunicamicina: 0.5μg/mL, 0.3μg/mL, 0.2μg/mL, y 0.1μg/mL. Se observó que la mutante *cnb1Δ* presentó deficiencias de crecimiento incluso en la concentración más baja de tunicamicina (0.1μg/mL), con un fenotipo similar en intensidad al de la mutante *ire1Δ* (**Figura 5, Anexo II**).

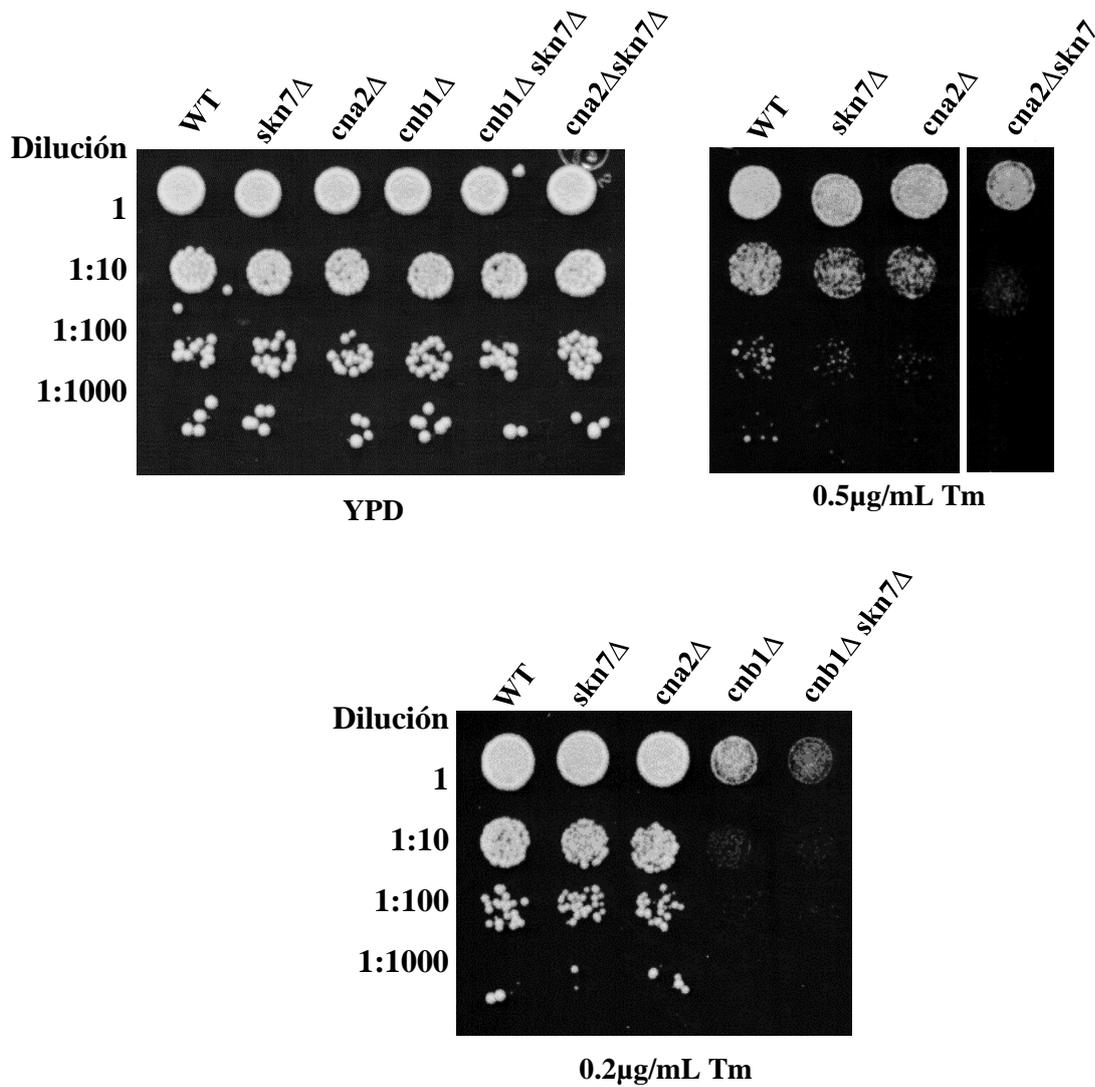


**Figura 5. La mutante nula de *CNBI* presenta un fenotipo extremo de sensibilidad a tunicamicina.** Ensayo de sensibilidad por goteo a ERE inducido por tunicamicina. Se comparó el fenotipo de las mutantes sencillas de *CNBI* y *CRZ1* con el del sensor de UPR *IRE1*. Tm: tunicamicina. YPD: medio rico. Dilución inicial: 0.08 OD<sup>600</sup>. Imagen recortada para resaltar los fenotipos; imagen original en **Anexo II**.

### *Skn7p* y Calcineurina se encuentran en vías de señalización paralelas en ERE

En trabajos previos, se observó un fenotipo de letalidad sintética en la doble mutante de los factores de transcripción Skn7p y Crz1p; esto, sumado al reporte de Williams *et al.* en 2002<sup>36</sup>, llevó a pensar en la existencia de una relación funcional entre la Vía de Calcio Intracelular y Skn7p. Para probar esta hipótesis, se realizaron dobles mutantes de Skn7p

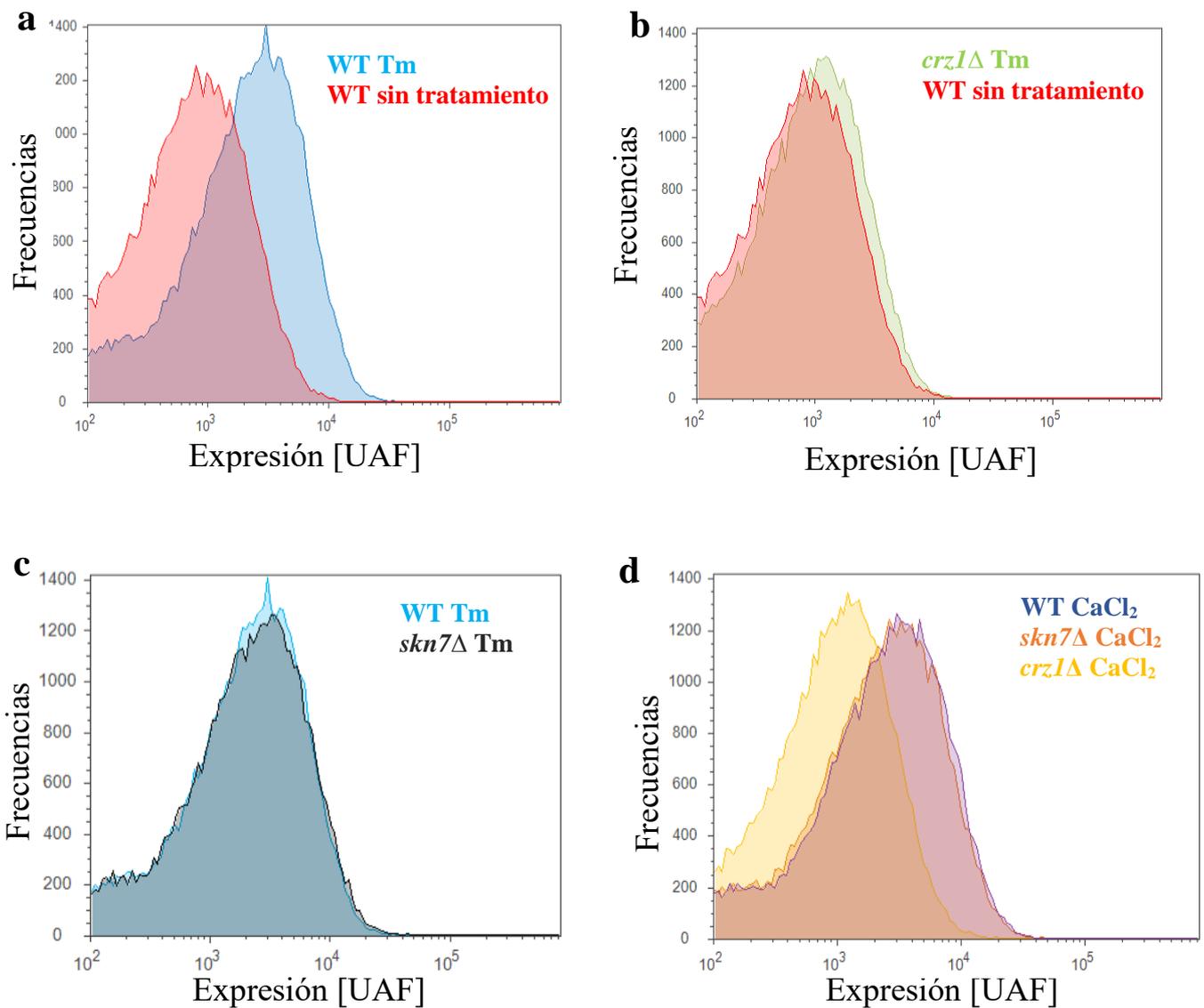
con los genes que codifican las distintas subunidades de Calcineurina y se evaluaron en ensayos de sensibilidad. De manera inesperada, se observó que las dobles mutantes no replican el fenotipo de letalidad sintética de la mutante *crz1Δskn7Δ*, sino que crecen sin deficiencias en condiciones normales, y presentan un fenotipo aditivo de sensibilidad al estrés inducido por tunicamicina, lo que indica que la Calcineurina y Skn7 participan en vías de señalización independientes (**Figura 6, Anexo III**).



**Figura 6. Skn7p y las distintas subunidades de Calcineurina se encuentran en vías separadas.** Ensayo de sensibilidad por goteo a ERE inducido por tunicamicina. Se compara el fenotipo de las mutantes dobles *cna2Δskn7Δ* y *cnb1Δskn7Δ* con el fenotipo de las mutantes sencillas. Tm: tunicamicina. YPD: medio rico. Dilución inicial: 0.08 OD<sup>600</sup>. Imágenes recortadas y reacomodadas para mayor claridad; imágenes originales en **Anexo III**.

### ***Crz1p activa la transcripción en respuesta a ERE***

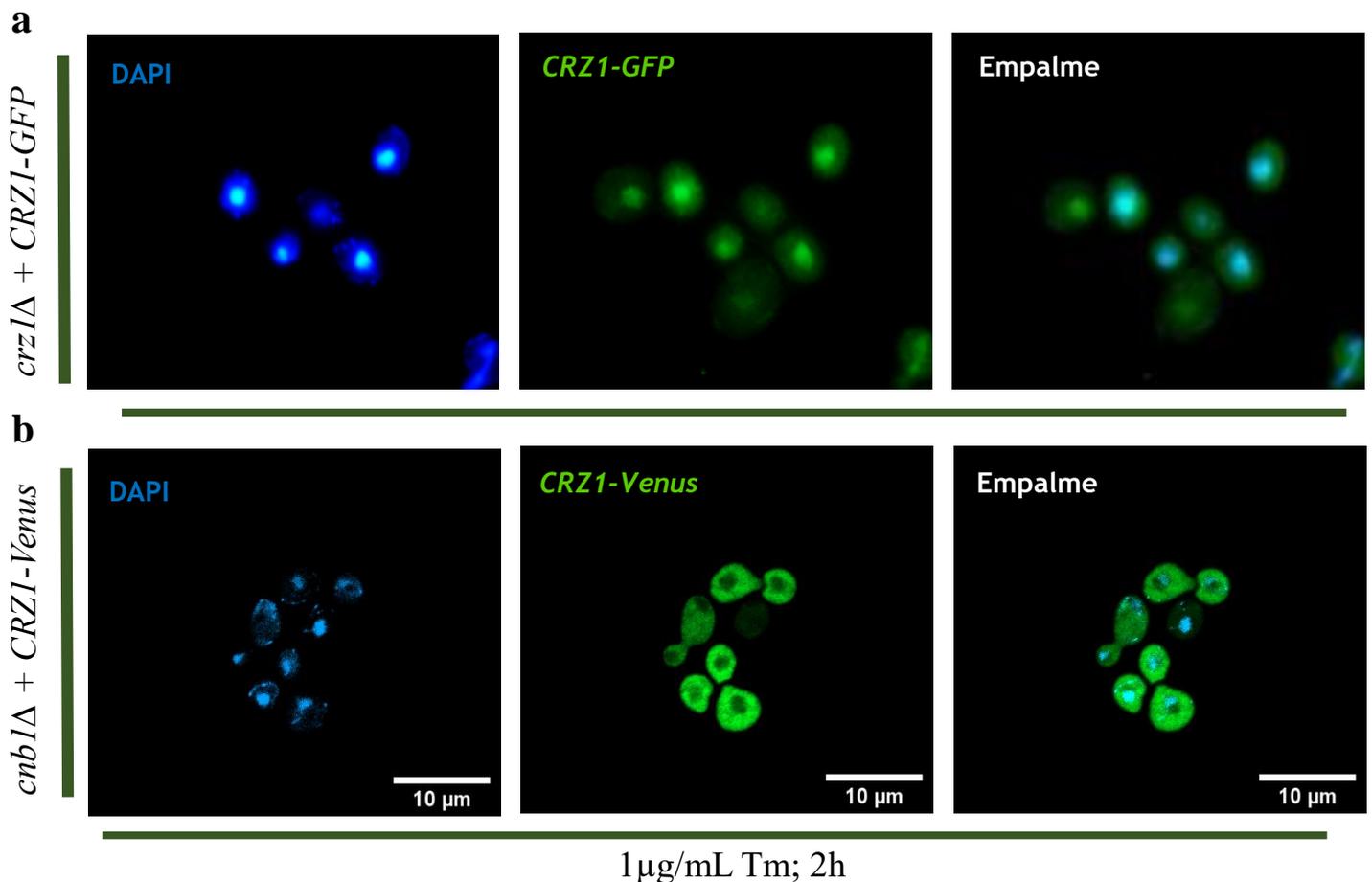
Crz1p cambia su localización citosólica por nuclear tras dos horas de inducción de estrés de retículo endoplásmico con tunicamicina<sup>23</sup>; este cambio de localización es considerado en la literatura como una marca de activación del factor de transcripción por la Vía de Calcio Intracelular<sup>35</sup>. Pese a tener el cambio de localización de Crz1p como evidencia de su activación, resulta necesario saber si la proteína está funcionando como factor de transcripción. Para contestar esta pregunta, se construyó el gen reportero  $P_{FKS2}$ -VENUS utilizando el promotor del gen dependiente de Crz1p, *FKS2*, y la proteína fluorescente Venus. La expresión del reportero se evaluó por citometría de flujo en la cepa silvestre y en las mutantes nulas de *SKN7* y *CRZ1*, en condiciones normales, bajo ERE inducido con tunicamicina y en condiciones de estrés por calcio como control positivo. Se observó un incremento en la expresión del reportero tras la inducción de ERE en la cepa silvestre (**Figura 7a**); no obstante, la expresión del reportero en la mutante *crz1* $\Delta$  se mantuvo constante aún en condiciones de estrés (**Figura 7b**), y de manera importante, no excedió la expresión basal observada en la cepa silvestre (**Figura 7b**). En acuerdo con lo observado en la **Figura 6**, pero contradiciendo los resultados expuestos en el reporte de Williams *et al.*<sup>36</sup>, la expresión del reportero en la mutante *skn7* $\Delta$  no muestra diferencia alguna con la expresión en la cepa silvestre en condiciones de estrés por calcio (**Figura 7d**) y tampoco en condiciones de ERE (**Figura 7c**). Esto indica que la tunicamicina induce la internalización nuclear de Crz1 y su actividad transcripcional sobre *FKS2* y que la expresión de este gen no depende de *Skn7* en condiciones de estrés.



**Figura 7. El estrés de retículo endoplásmico induce la expresión del gen *FKS2* de manera dependiente de *Crz1p* e independiente de *Skn7p*.** Ensayo de actividad de reportero de la proteína fluorescente Venus bajo control del promotor de *FKS2*. Se observa el fenotipo de la cepa silvestre en condiciones de ERE o en condiciones normales, y se compara con las mutantes *crz1*Δ y *skn7*Δ. TN: tunicamicina. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

### *Cnb1p se requiere para la activación de Crz1p*

Como parte de la Vía de Calcio Intracelular, y en respuesta a incrementos en la concentración de calcio citosólico, Crz1p se localiza en el núcleo tras ser desfosforilado por Calcineurina. En condiciones de ERE, no se había estudiado si el cambio de localización de Crz1p es dependiente de Calcineurina. Para estudiar esta posibilidad, se etiquetó a *CRZ1* con la proteína fluorescente Venus y se siguió su localización durante dos horas de inducción de ERE con tunicamicina en una mutante nula para la subunidad reguladora de Calcineurina (*cnb1Δ*). En contraste con lo reportado para la cepa silvestre<sup>23</sup>, en la mutante *cnb1Δ* no se observaron cambios en la localización de Crz1-Venus, que mantuvo una distribución difusa en el citosol en todos los tiempos analizados (**Figura 8**).



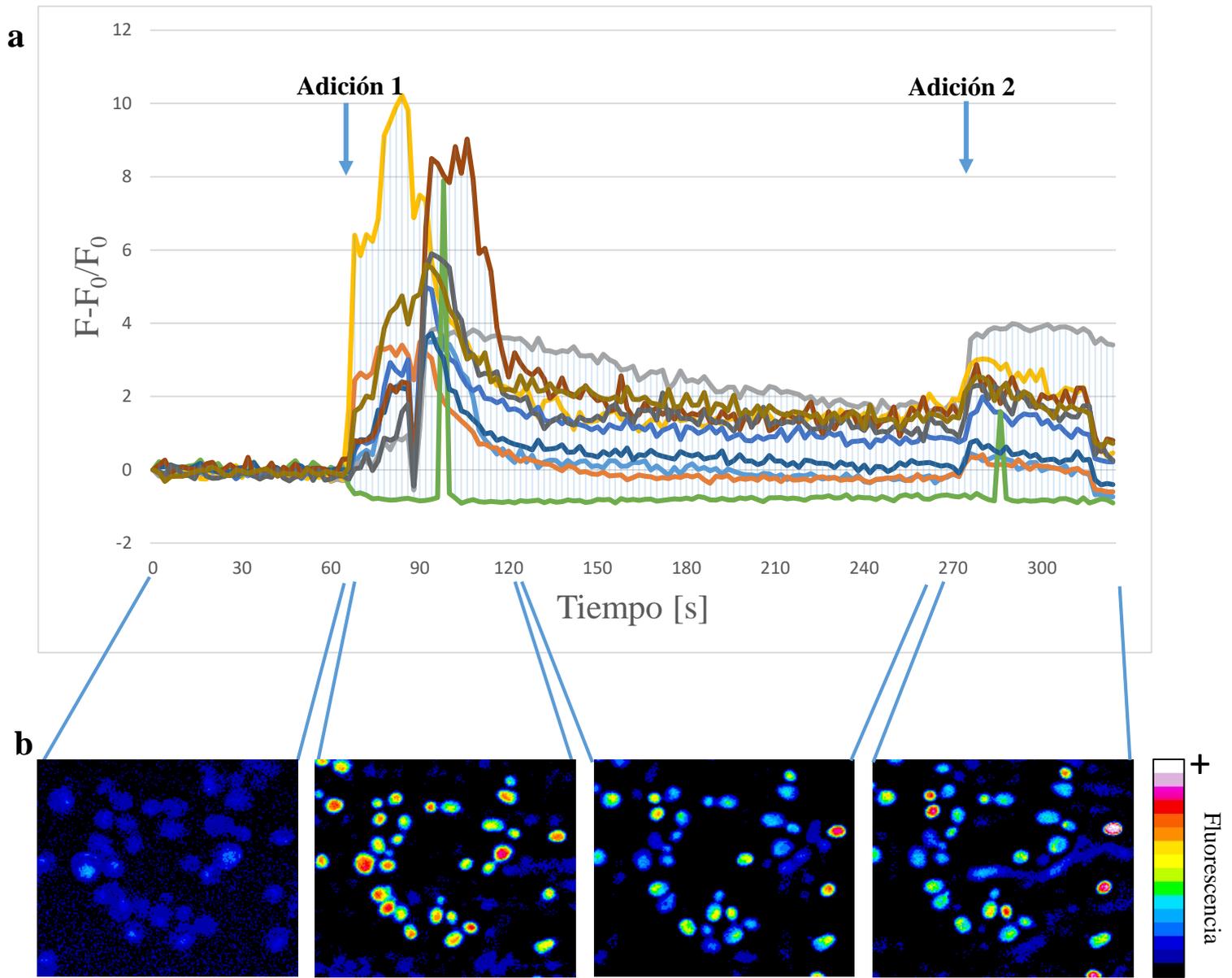
**Figura 8. El cambio de localización de Crz1p en condiciones de ERE depende de la subunidad reguladora de Calcineurina.** Micrografías de fluorescencia en campo amplio o en confocal de escaneo. Se muestra la localización subcelular de Crz1p en las mutantes nulas de *CRZ1* (a) y de *CNBI* (b) tras dos horas de inducción de ERE con 1 μg/mL de tunicamicina. Tm: tunicamicina. Panel a modificado de Olivares A.E., 2017.

***El flujo de calcio intracelular inducido por CaCl<sub>2</sub> extracelular se puede detectar con el indicador B-GECO en S. cerevisiae***

Las proteínas GECO son los indicadores de calcio genéticamente codificados de más reciente desarrollo y presentan múltiples ventajas para el estudio de la dinámica de calcio. El plásmido CMV-B-GECO contiene una versión de las proteínas GECO cuyo espectro de emisión tiene un máximo en 446nm (color azul) y se emplea para detectar flujos de calcio en células de animales<sup>47</sup>. Por medio de digestiones con endonucleasas sitio específicas, se obtuvo el cDNA de B-GECO y se subclonó en el plásmido de expresión de levaduras pYES2, bajo la regulación del promotor de expresión constitutiva P<sub>OXA1</sub>; la expresión del indicador fue satisfactoria y se procedió a evaluar su funcionamiento en levaduras.

Se decidió evaluar el funcionamiento del indicador utilizando microscopía confocal y con la adición de CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 200mM. Está reportado que en esta condición existe un incremento considerable en el calcio citosólico debido a la entrada del ion desde el medio externo; además, es la condición más utilizada para el estudio de la activación de la Vía de Respuesta a Calcio Intracelular. Al agregar el cloruro de calcio, se observó un incremento de hasta doce veces en la intensidad de fluorescencia, seguido de una disminución asintótica hacia la fluorescencia basal, con un segundo pulso de calcio se observó un nuevo incremento en la fluorescencia, aunque de menor magnitud (**Figura 9**).

El comportamiento observado en la **Figura 9** es típico de los flujos transitorios de calcio observados en otros sistemas y coincide con lo observado por otros métodos de medición de Ca<sup>++</sup> en *S. cerevisiae*<sup>26,28,29</sup>, por lo que concluimos que el indicador BGECO puede reportar la dinámica de calcio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

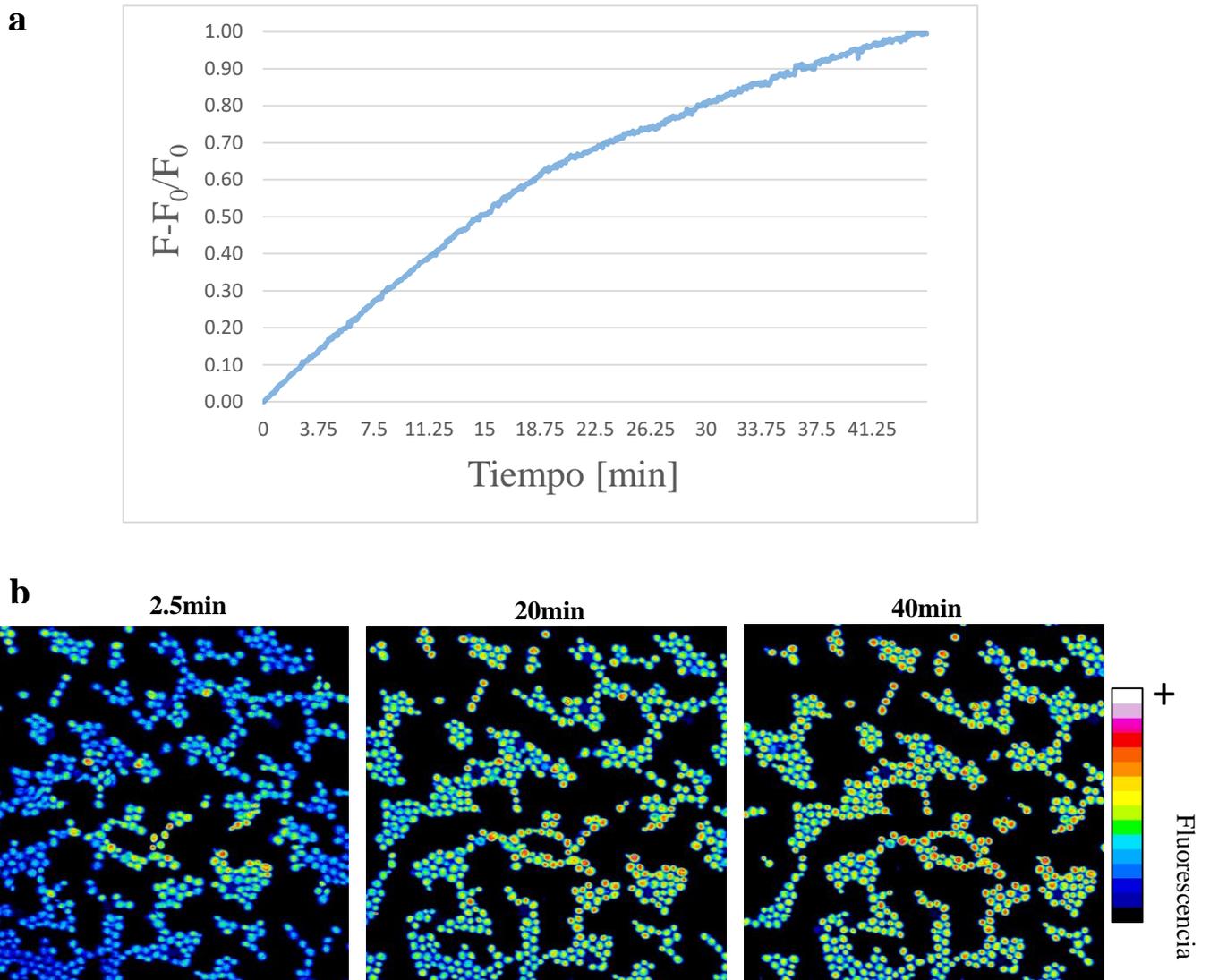


**Figura 9. Cambios en fluorescencia en células transformadas con el indicador B-GECO.** Cambios en intensidad de fluorescencia contra tiempo en células individuales. **a)** Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada contra tiempo de 10 células únicas seleccionadas al azar. Las flechas indican la adición de  $40\mu\text{L/mL}$  de  $\text{CaCl}_2$  5M. Concentración de calcio en el medio tras adiciones: adición 1: 200mM; adición 2: 400mM. **b)** Proyecciones máximas representativas de la intensidad de fluorescencia de la población de células durante distintos intervalos de tiempo. Intervalos indicados sobre el eje x del gráfico en **a**. Se muestra la escala de color utilizada. F: fluorescencia.  $F_0$ : Fluorescencia inicial. s: segundos

### *El calcio citosólico incrementa progresivamente durante el ERE*

El cambio de localización de *CRZI-VENUS* en respuesta a estrés de retículo endoplásmico, y su dependencia de la Calcineurina sugieren que la tunicamicina induce un incremento en la concentración de calcio citosólico ( $[\text{Ca}]_{\text{cyt}}$ ), para estudiar esta posibilidad, se utilizó el indicador B-GECO en condiciones de ERE inducido por

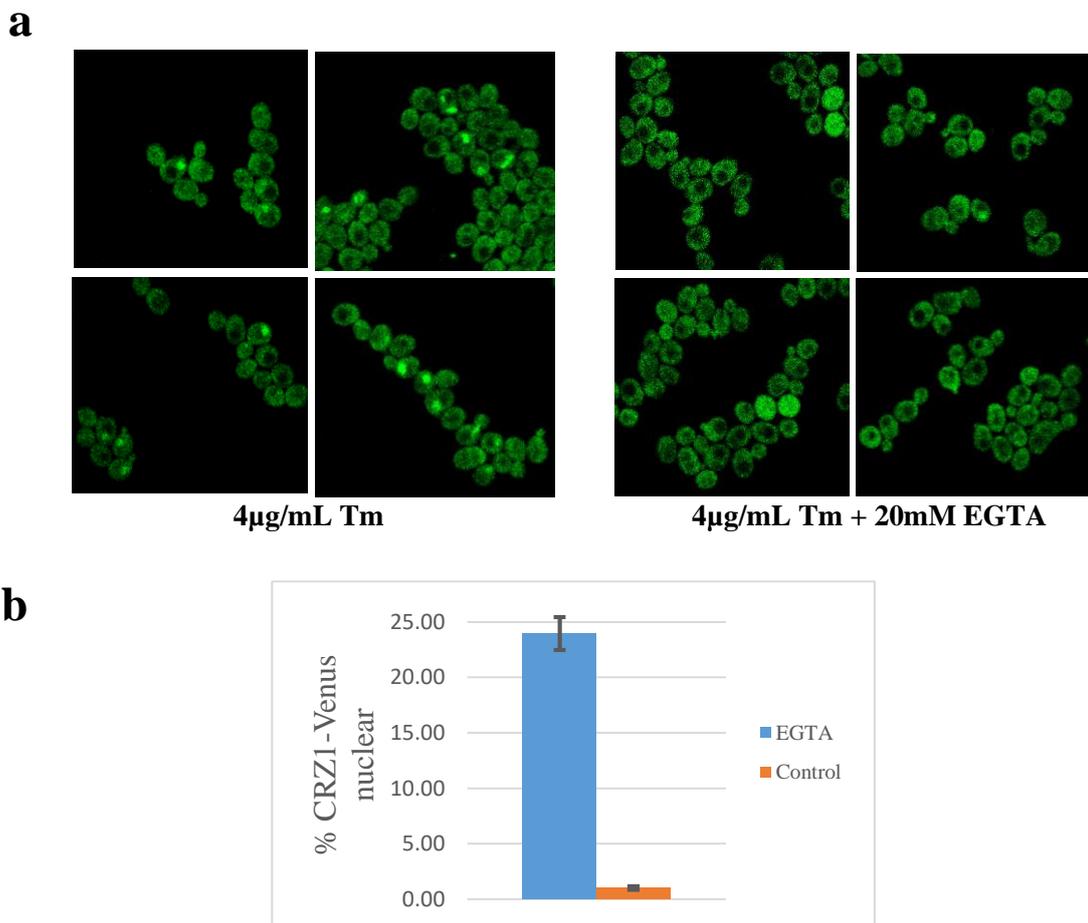
tunicamicina. Como un experimento preliminar, se siguió la fluorescencia del indicador por microscopía confocal durante cuarenta minutos, y se registró una imagen cada tres segundos. Este experimento se hizo en presencia de 4µg/mL de tunicamicina. Esta concentración induce una rápida respuesta de la Vía de Intracelular de Calcio y la internalización nuclear de *CRZI-GFP* a partir de los 30 minutos de tratamiento (datos no mostrados). En estas condiciones se observó un incremento progresivo en la fluorescencia sin que se observara decaimiento en los tiempos de duración del tratamiento (**Figura 10**), lo que sugiere que el ERE inducido por tunicamicina provoca un flujo sostenido de calcio hacia el citosol; sin embargo, este es un experimento único y se requieren más réplicas para demostrar estos datos.



**Figura 10. El calcio citosólico incrementa en células tratadas con tunicamicina.** Cambios en intensidad de fluorescencia contra tiempo. **a)** Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada contra tiempo del campo de observación completo. **b)** Proyecciones máximas representativas de la intensidad de fluorescencia de la población de células durante distintos intervalos de tiempo. Se muestra la escala de color utilizada.

### ***CRZI-VENUS no se localiza al núcleo si se secuestra el calcio externo***

Para contestar si el incremento de calcio se debe a flujos de pozas intracelulares o del medio externo, se siguió la localización de *CRZI-VENUS* por microscopía confocal en condiciones de ERE en presencia de EGTA—un quelante de calcio que no puede atravesar la membrana plasmática. Se incubó a las células con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina en ausencia y en presencia de 30mM de EGTA durante 30 min. Se encontró que en presencia de EGTA sólo el 1.40% ( $\pm 0.15$ ) de las células muestran a Crz1 en el núcleo, mientras que Crz1 se localiza en el núcleo en el 23.96% ( $\pm 1.48$ ) de las células tratadas solamente con tunicamicina (**Figura 11A y 11b, Anexo IV**). Esto sugiere que la activación de la vía de Calcio Intracelular por tunicamicina, depende del calcio extracelular.



**Figura 11. El cambio de localización de *CRZI-VENUS* disminuye en presencia de EGTA.** Localización de Crz1p en condiciones de ERE inducido por tunicamicina. **a)** Proyecciones máximas obtenidas a partir de 10 imágenes colectadas desde el minuto 12 de inducción hasta el minuto 42. Se muestra una composición de campos representativos de las imágenes originales\*. **b)** Porcentaje de células con CRZI-Venus localizado en núcleo en las condiciones probadas. Tm: tunicamicina. \*Imágenes originales en Anexo IV.

## Discusión

Una de las funciones esenciales del retículo endoplásmico (RE) es el almacenamiento de calcio; este ion tiene numerosas funciones en las células eucariotes.

En células animales, las funciones del calcio están ampliamente descritas, siendo la biología del calcio un área de investigación fructífera y en constante avance. El ion calcio participa en procesos muy diferentes que incluyen la regulación del metabolismo, la diferenciación, la fecundación, el aprendizaje, y el plegamiento de proteínas, entre muchos otros. En levaduras, sin embargo, la investigación sobre la biología de este catión es muy escasa y se desconoce si la importancia del ion es similar a la descrita en animales.

El calcio es de extrema importancia para el plegamiento de las proteínas de la vía secretora en metazoarios. Este ion se encuentra asociado a las chaperonas más importantes del retículo endoplásmico y es esencial para su actividad<sup>10,12,15-18,48</sup>. Aunque este fenómeno está descrito para las chaperonas animales, en los ortólogos de *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que el calcio no es esencial para su actividad catalítica<sup>14,21</sup>. No obstante, el calcio se almacena en grandes cantidades en el RE así como en otros organelos de la vía secretora<sup>5,11,14,20</sup>, y hay indicios de que la disminución en su concentración en el RE activa la vía de Respuesta a Proteínas Mal Plegadas<sup>22</sup>. Aún así, no se ha estudiado si los inductores de estrés de RE activan la vía de Calcio y si ésta es necesaria para que la célula responda a las condiciones de estrés.

### *Cnb1p tiene un papel esencial en la supervivencia a ERE*

En un trabajo previo<sup>23</sup>, así como en trabajos publicados por otros grupos<sup>22,49</sup>, se ha mostrado que mutantes nulas de la subunidad reguladora de Calcineurina, *CNBI*, no presentan crecimiento a concentraciones moderadas y altas de tunicamicina, sin embargo, este fenotipo no ha sido analizado con detalle y no se ha determinado si es exclusivo de concentraciones altas de tunicamicina.

En este trabajo se planteó encontrar la concentración mínima de tunicamicina que permitiera el crecimiento de la cepa *cnb1Δ*. Aunque se observó crecimiento en concentraciones de 0.2 µg/mL y 0.1 µg/mL de tunicamicina, este nunca fue comparable al de la cepa silvestre, y de manera importante, fue apenas más robusto que el de la mutante nula del sensor de UPR, *Ire1p*.

Los fenotipos de alta sensibilidad son de enorme importancia en el estudio de la señalización celular porque permiten determinar qué funciones son vitales para procesos celulares específicos y cuáles son dispensables o tienen una relevancia menor. En este sentido, la comparación del fenotipo de la mutante *cnb1Δ* con la mutante *ire1Δ* es altamente informativa, ya que la última representa el sensor más importante al ERE en levaduras, así como el eje central de la respuesta a este estrés<sup>50-52</sup>. El fenotipo ligeramente menos sensible de la mutante nula de *CNBI* demuestra que Calcineurina realiza funciones de extrema importancia para la homeostasis del RE, y dada la relación tan estrecha de esta fosfatasa con la biología del calcio, se puede hipotetizar que la homeostasis del calcio y la homeostasis del RE son fenómenos muy relacionados.

#### *Skn7p y Calcineurina se encuentran en vías de señalización paralelas en la respuesta a ERE*

En 2001 Williams *et al.* reportaron una asociación física y genética entre el factor de transcripción Skn7p y la Vía de Calcio Intracelular en condiciones de estrés por calcio extracelular; particularmente, reportaron una interacción física *in vitro* entre las distintas subunidades de Calcineurina y Skn7p<sup>36</sup>. Si a estas observaciones se agrega el fenotipo de letalidad sintética de la doble mutante *crz1Δskn7Δ* y la sensibilidad a inductores de estrés de las mutantes nulas de Calcineurina, se puede pensar que hay una relación funcional directa entre Calcineurina y Skn7 en condiciones de estrés de RE. Sin embargo, nuestros datos de epistasis con las dobles mutantes de Skn7 y las subunidades de Calcineurina muestran que la Calcineurina y Skn7 actúan en vías independientes y quizás paralelas.

#### *Crz1p activa la transcripción en respuesta a ERE*

La activación de la vía de calcio intracelular conduce a la internalización nuclear de Crz1 y a su actividad transcripcional sobre genes de respuesta incluyendo a *FKS2*. En este trabajo encontramos que también la inducción de estrés de RE induce la internalización de Crz1 y este activa también la transcripción de *FKS2*. El aumento en la expresión de *FKS2* no se observa en una mutante *crz1Δ*. En condiciones de estrés de RE sin embargo, la expresión de *FKS2* es independiente de Skn7 lo que es congruente con los fenotipos de las dobles mutantes *cnb1Δskn7Δ* y *cna2Δskn7Δ*. Esto indica que Crz1 y

Skn7 actúan en vías independientes en respuesta a estrés de RE. Adicionalmente en éste trabajo encontramos que la expresión de *FKS2* en respuesta a la activación de la vía de Calcio no depende de Skn7 como se reportó previamente<sup>36</sup>. En este aspecto es importante profundizar en el papel que pueda tener Skn7 en la vía de calcio Intracelular para resolver esta controversia.

#### *Cnb1p se requiere para la activación de Crz1p en condiciones de estrés de RE*

En condiciones de estrés por calcio, Calcineurina desfosforila a Crz1p y promueve su importación nuclear<sup>35,40</sup>. En condiciones de ERE inducido por tunicamicina, hemos observado que Crz1p se localiza en el núcleo y activa la transcripción; además, se reporta que Calcineurina es necesaria para la supervivencia en estas condiciones<sup>22,23,49</sup>. No obstante, no se había determinado si los dos eventos mencionados anteriormente estaban relacionados.

Para determinar si Calcineurina se requiere para la activación de Crz1p, se siguió la localización *CRZI-VENUS* en la mutante nula de *cnb1Δ*. Se encontró que, en este fondo genético, Crz1p no se localiza al núcleo en ERE inducido por tunicamicina; con lo que se demostró que la activación del factor de transcripción en estas condiciones es mediada por Calcineurina.

#### *El indicador B-GECO permite seguir la dinámica del calcio en S. cerevisiae*

En contraste con la plétora de reportes realizados en células animales, la biología del calcio ha sido pobremente estudiada en levaduras. Este fenómeno se explica por la incompatibilidad de los indicadores de calcio para seguir la dinámica del calcio en levaduras: por un lado, se ha mostrado que el procesamiento de los indicadores químicos acetoximetilados de amplio uso en células animales es distinto en levaduras, lo que conlleva a su acumulación en la vacuola, el organelo más rico en calcio en hongos; por otro lado, los indicadores de calcio codificados genéticamente (GECI) fueron desarrollados para su uso específico en células de mamífero y todos los constructos genéticos disponibles se valen de herramientas de regulación y expresión propias de las células de mamífero.

En los escasos estudios referentes a la biología del calcio en levaduras, se han utilizado herramientas discontinuadas como el  $\text{Ca}^{45}$  y la proteína luminiscente Acuorina. El uso de dichas herramientas ha disminuido, en el caso del  $\text{Ca}^{45}$ , debido a que sólo permite análisis a nivel poblacional, a su riesgo de uso y a la imposibilidad de seguir dinámicas en tiempo real; mientras que, en el caso de la Acuorina, su abandono ha sido motivado por su escasa disponibilidad comercial y las complejidades que añade al diseño experimental la necesidad de adicionar el sustrato de la enzima luminiscente. De manera significativa para el objetivo de este trabajo, en 2017 Carbó *et al.* reportaron la adaptación del indicador GCAMP para su uso en *S. cerevisiae*, donde se mostraron datos prometedores para el uso de estas proteínas en levaduras. Sin embargo, pese a sus excelentes resultados, este grupo optó por integrar el gen de GCAMP en un locus genómico, lo que representa una limitante para generalizar el uso de esta herramienta.

Las razones expuestas anteriormente, motivaron la adaptación y validación de un GECEI para su uso en *S. cerevisiae*. Se optó por las proteínas GECEI, reportadas en 2011 por el grupo del Prof. Campbell; estas proteínas son derivadas de las GCAMP, y tienen sustanciales mejoras en términos de cambios en intensidad de fluorescencia y de afinidad, además de estar disponibles en tres espectros de excitación/emisión ampliamente separadas entre sí<sup>47</sup>. Se consideró importante adaptar los sensores GECEI a un sistema de expresión episomal con la finalidad de facilitar su uso en levaduras de distintas cepas y garantizar niveles altos de expresión de los indicadores.

Se subclonaron los genes de GECEI en el plásmido de expresión en levaduras pYES2 y fueron sujetos a el promotor constitutivo  $P_{OXA}$ . Aunque originalmente se utilizaron las versiones azul y verde de GECEI (BGECEI y GGECEI, respectivamente), se observó que GGECEI presentaba un efecto considerable de fotoblanqueamiento que dificultó su uso en periodos de tratamiento prolongados, este efecto no se encontró en BGECEI, donde la intensidad de fluorescencia en ausencia de estímulos disminuyó de manera sutil que no interfirió con el análisis durante los tiempos estudiados (hasta dos horas; datos no mostrados). Aunque GGECEI tiene como ventaja un porcentaje de cambio en intensidad de fluorescencia que triplica el de BGECEI (700% en BGECEI, 2600% en GGECEI)<sup>47</sup>, se optó por el uso de la última debido a que largos los tiempos de estimulación bajo estrés de retículo endoplásmico imposibilitarían el uso de la versión verde del indicador.

La validación del indicador BGECO se realizó con  $\text{CaCl}_2$ , para el que el incremento en la  $[\text{Ca}]_{\text{cyt}}$  ha sido ampliamente descrito con otras metodologías y es de relevancia para la activación de la Vía de Calcio Intracelular. Inmediatamente después de la adición de  $\text{CaCl}_2$  en el medio, se observó un claro incremento en la intensidad de fluorescencia, este cambio fue homogéneo en las distintas células presentes en el campo de observación, y decayó con el paso del tiempo. Este dato coincide con lo reportado anteriormente para el estrés por calcio y señala que la adaptación realizada del indicador BGECO, es adecuada para el seguimiento de la dinámica del calcio en *S. cerevisiae*.

#### *El calcio citosólico incrementa progresivamente durante el ERE*

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que existen incrementos en el calcio citosólico durante el ERE. Específicamente, esta hipótesis se genera tras observar el cambio de localización de Crz1p y su dependencia de Calcineurina, ya que la actividad de Calcineurina es directa e indirectamente regulada por incrementos de calcio en el citosol. Sin embargo, pese a que múltiples artículos en la literatura toman la activación de Calcineurina y el cambio de localización de Crz1p como evidencia de un incremento en la  $[\text{Ca}]_{\text{cyt}}$ , este fenómeno se da por hecho y rara vez se verifica.

Para el estrés de retículo endoplásmico en levaduras, donde la conexión entre homeostasis del organelo y homeostasis del calcio no están claramente establecidas, es fundamental determinar si el ion está movilizándose en respuesta o en consecuencia al estrés. Con este fin se utilizó el indicador BGECO para seguir en tiempo real la dinámica del calcio en condiciones de ERE. Los datos preliminares mostrados en este trabajo indican que el calcio citosólico incrementa en condiciones de ERE, sin embargo, la curva observada es sumamente anormal y difiere de las dinámicas de calcio reportadas en otros sistemas. El incremento observado es mínimo y además no parece estar limitado por los mecanismos celulares de recuperación de calcio (como bombas y transportadores organelares de calcio). Estas anomalías sugieren que el efecto observado podría deberse a un artefacto experimental y no permiten obtener conclusiones claras sobre el fenómeno. Para definir si el incremento observado se debe a un artefacto o es un efecto real, haría falta incrementar el número de repeticiones del experimento y tratar de controlar variables experimentales que pudieran generar ruido en el análisis.

### *CRZ1p no se transporta al núcleo si se secuestra el calcio externo*

Tras haber probado que el calcio citosólico incrementa en condiciones de estrés de retículo endoplásmico, se consideró la posibilidad de estudiar la fuente de este incremento. Se tenía como hipótesis que el calcio saliera del RE a manera de una fuga lenta y progresiva a causa de la pérdida de homeostasis del organelo, o como un evento agudo de señalización que notificara a la célula del estado anormal del RE. Sin embargo, no se ha reportado flujo de calcio desde el RE en levaduras y tampoco se han identificado canales de calcio que puedan permitirlos. Una hipótesis alternativa es que el calcio proviniera del medio externo y entrara a través de alguno de los canales de calcio membranales, como ocurre en el estrés por calcio extracelular o en la estimulación por feromona.

Para distinguir entre las posibilidades mencionadas, se utilizó un quelante de calcio incapaz de cruzar la membrana plasmática y se analizó la activación de la vía mediante el cambio de localización de *CRZI-VENUS*. La inducción de ERE en presencia de este quelante resultó en una reducción dramática de la localización de Crz1p en el núcleo. Este cambio, casi absoluto, sugiere que el flujo de calcio responsable de la activación de la Vía de Calcio Intracelular proviene del exterior. No obstante, esta observación no excluye que, en condiciones de estrés de RE, exista también flujo de calcio desde los diferentes organelos, incluyendo al RE y a la mitocondria. Para comprobar esto se tiene la perspectiva de construir reporteros de BGECO con señales de internalización al RE y a la mitocondria. De la misma manera será importante medir la dinámica de activación de BGECO en presencia de EGTA.

## Conclusiones

- La subunidad reguladora de la Calcineurina, Cnb1p, es esencial para la supervivencia a ERE inducido por tunicamicina.
- La mutante *cnb1Δ* presenta un fenotipo de sensibilidad de similar magnitud al de la mutante nula del sensor más importante de la UPR, Ire1p.
- El factor de transcripción Skn7p y Calcineurina participan en vías de señalización paralelas.
- Crz1p activa la transcripción de *FKS2* en condiciones de estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.
- Crz1p y Skn7p no actúan sinérgicamente durante la activación transcripcional de *FKS2* inducida por tunicamicina.
- Calcineurina activa a Crz1p en condiciones de ERE inducido por tunicamicina.
- El indicador BGECO permite reportar la dinámica del calcio en *Saccharomyces cerevisiae*.
- El calcio citosólico incrementa durante el ERE inducido por tunicamicina.
- El calcio responsable de la activación de la Vía de Calcio Intracelular en condiciones de ERE inducido por tunicamicina proviene del medio extracelular.

## 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
<b>WT BY4742</b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0
<b>crz1<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 crz1::KANMX
<b>cnb1<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 cnb1::KANMX
<b>cna2<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 cna2::KANMX
<b>skn7<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 skn7::KANMX
<b>cnb1<math>\Delta</math>skn7<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 cnb1::KANMX skn7::URA3
<b>cna2<math>\Delta</math>skn7<math>\Delta</math></b>	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 cna2::KANMX skn7::URA3

### *Construcciones genéticas*

Todas las construcciones genéticas descritas en este trabajo fueron elaboradas por el autor del mismo; la documentación relacionada a las mismas (mapas, secuencias), así como el material biológico correspondiente pueden ser solicitadas en el Laboratorio 124 Norte de la División de Ciencia Básica del Instituto de Fisiología Celular o al correo electrónico: [aolivares@ifc.unam.mx](mailto:aolivares@ifc.unam.mx)

### *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 Na<sub>2</sub>EDTA), 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% preparada en buffer SB. 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 $\alpha$  de *Escherichia coli* fueron utilizadas para amplificar los plásmidos con las distintas construcciones utilizadas a lo largo de este trabajo. Se tomaron 100  $\mu$ L de cultivos ajustados a OD<sup>600</sup>=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 $\mu$ 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 OD<sup>600</sup>=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 $\mu$ L de suspensión y se mezclaron con ~200ng de DNA circular o con ~1 $\mu$ g de DNA linear y con 300 $\mu$ 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 $\mu$ 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 100 $\mu$ L y se plaqueó en cajas con medio selectivo.

### *Construcción del reportero pFKS2-Venus*

Se amplificó una región correspondiente a 1000 pares de bases río arriba del codón de inicio del gen *FKS2* a partir de DNA genómico de la cepa WT BY4742 con los oligonucleótidos FWpFKS2 y RVpFKS2; se purificó el producto de PCR y se ligó en el vector de clonación pGEM T-Easy. A la par, se subclonó la proteína fluorescente venus en el vector de expresión en levaduras YEp352, para obtener el vector YEp352-Venus. Finalmente, se subclonó el promotor en el vector YEp352-Venus.

### *Construcción del sensor de calcio pYES2-P<sub>OXA</sub>-BGECO*

Este plásmido se construyó con la finalidad de adaptar el sensor de calcio GECO, de amplio uso en animales, a un vector que permitiera su expresión en levaduras. Se insertó el gen del sensor *BGECO*, obtenido a partir de digestión del plásmido *CMV-BGECO*<sup>47</sup> con las enzimas BamHI y EcoRI, en orientación 5' a 3', en la región *polylinker* del plásmido comercial pYES2. Posteriormente se insertó el promotor P<sub>OXA1</sub> en orientación 5' a 3' en relación al gen *BGECO*.

### *Electroforesis en agarosa*

Todas las corridas de electroforesis fueron realizadas en geles de agarosa al 0.8% (w/v) preparados en buffer de Borato de Sodio (SB).

### *Elaboración y selección de mutantes dobles*

Se amplificó por PCR una construcción con el gen de *SKN7* interrumpido por el gen *URA3* usando los primers Skn7FWD y Skn7RV. Esta construcción fue transformada en

las mutantes sencillas *cna2Δ* y *cnb1Δ*, y las transformantes fueron plaqueadas en medio mínimo sin uracilo. Se tomó con un palillo una cantidad mínima de células de las colonias obtenidas y se diluyó en 100μL de medio, de esta dilución se tomaron 3.5μL y se colocaron gotas en medio con t-BOOH para distinguir a las dobles mutantes.

#### *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 0.5. Se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 a partir de la dilución inicial ( $OD^{600}=0.5$ ). 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.

#### *Citometría de flujo*

Se realizaron diluciones a OD 0.2 a partir de cultivos saturados; estas diluciones fueron recuperadas por 1h30min en YPD; posteriormente, se aplicaron los tratamientos correspondientes; al término de cada tratamiento, se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 30min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Las lecturas se realizaron en un citómetro Attune con láseres azul/violeta. Se analizaron 50,000 células separadas (singletes) por muestra.

### *Ensayo de flujo de calcio por adición de CaCl<sub>2</sub> externo*

Se obtuvieron cultivos en medio líquido a una OD<sup>600</sup> 0.8, de los que fueron sembrados 150µL en cajas de Petri con fondo de vidrio previamente tratadas con Poli-L-lisina (1mg/mL ON; tres lavados con agua antes de sembrar). Se dejó a las células adherirse durante al menos quince minutos a 30°C, posteriormente se añadió medio SC cuidadosamente por los bordes de la caja para evitar desprender las células.

Las células fueron seguidas por un microscopio confocal de escaneo Zeiss LSM800, con los parámetros de excitación/emisión pre-establecidos por el software del microscopio para el fluorocromo DiAce y una temperatura de incubación húmeda de 27°C. Se utilizó un *pinhole* de 2 unidades de Airy y una intensidad de láser de 5%. Se tomaron imágenes cada tres segundos, durante al menos 10 minutos. En los tiempos indicados en el histograma, se añadieron 40µL por mL de medio de una solución acuosa al 5M de Cloruro de Calcio, para llegar a una concentración final de 200mM y 400mM.n

### *Preparación de parches de agarosa para ensayos de microscopía confocal*

Para inmovilizar a las levaduras durante periodos prolongados de tiempo se hicieron parches de agarosa al 1%. La agarosa fue fundida en medio SC, y volúmenes de un mililitro fueron vertidos en los pozos de una caja de cultivo de tejidos de 12 pozos; cuando fuere pertinente, los distintos tratamientos fueron mezclados con la agarosa fundida.

### *Ensayo de flujo de calcio por ERE*

Se obtuvieron cultivos en medio líquido a una OD<sup>600</sup> 0.8, de los que fueron sembrados 4µL sobre parches de agarosa con 4µg/mL de tunicamicina. Los parches fueron colocados

sobre cajas de Petri con fondo de vidrio de manera que las células quedaran orientadas hacia el vidrio. Inmediatamente después del montaje de las células se procedió a realizar la observación al microscopio. Los parámetros de microscopía y el instrumento utilizados fueron los mismos que en los *ensayos de flujo de calcio por adición de CaCl<sub>2</sub> externo*, con la diferencia de haber seguido a las células durante al menos cuarenta minutos.

#### *Análisis de intensidad de fluorescencia para los ensayos de flujo de calcio*

Las imágenes de microscopía confocal fueron importadas al programa FIJI (Fiji Is Just ImageJ). Se seleccionaron regiones de interés (ROI), que consistieron en: células individuales, en el ensayo con CaCl<sub>2</sub>; o el campo completo de observación, en el caso del ensayo con ERE. Se obtuvieron los valores de fluorescencia de los ROIs y se normalizaron con la fórmula:  $F - F_0 / F_0$ , donde F equivale al valor de fluorescencia en un tiempo x, y F<sub>0</sub> al valor de fluorescencia basal (tomado como el valor inicial de fluorescencia). Los valores normalizados fueron graficados contra el tiempo.

#### *Ensayo de localización de CRZI-Venus*

Se obtuvieron cultivos en medio líquido a una OD<sup>600</sup> 0.8. Se sembraron 4μL sobre parches de agarosa e inmediatamente se procedió a su observación por microscopía confocal. Se utilizó un microscopio confocal de escaneo Zeiss LSM800 con los parámetros de excitación/emisión pre-establecidos por el software del microscopio para el fluorocromo Tag-YFP y una temperatura de incubación húmeda de 27°C. Se configuró el *pinhole* a una unidad de Airy y la intensidad del láser a 2%. Se tomaron imágenes cada tres minutos durante 45 minutos.

## **Anexo I**

### *Abreviaturas utilizadas*

$\beta$ -Me:  $\beta$ -Mercaptoetanol

CC: *Coiled-Coil*.

CDRE: Elemento de Respuesta Dependiente de Calcineurina.

DBD: Dominio de Unión con DNA

DMSO: dimetilsulfóxido.

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

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA: ácido etilén-glicol-bis( $\beta$ -aminoetiléter)-tetraacético

GFP: Proteína Verde Fluorescente.

KDa: Kilodaltones

OD: Densidad Óptica.

pb: pares de bases

PEG: polietilenglicol.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

T<sub>m</sub>: tunicamicina.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

SPCA: ATPasa de Calcio de Vía Secretora

SERCA: ATPasa de Calcio de Retículo Sarco/Endoplásmico

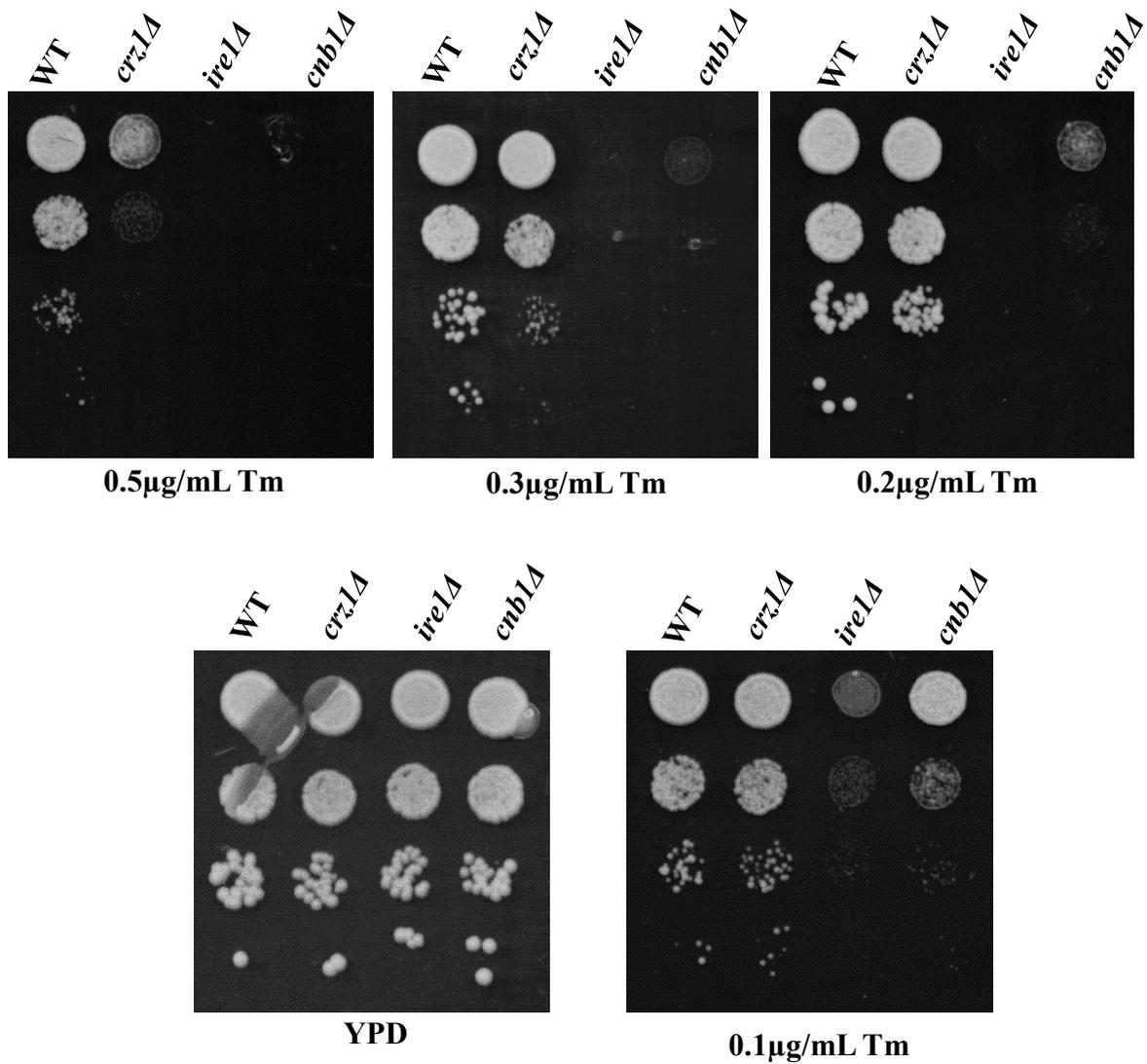
HACS: Sistema de flujo de Calcio de Alta Afinidad

LACS: Sistema de flujo de Calcio de Baja Afinidad

IP3: Inositol-3-fosfato

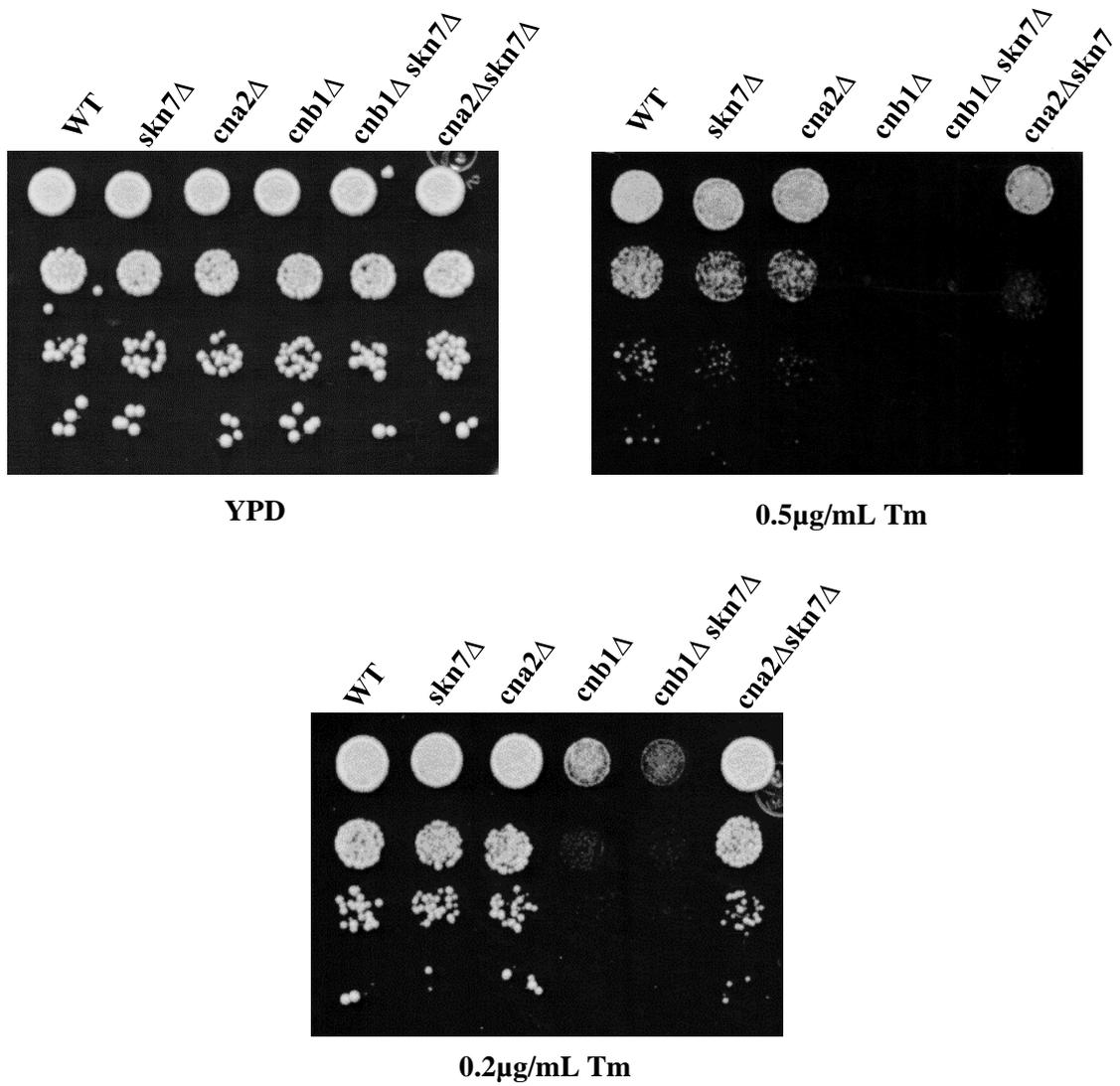
UPR: Respuesta a Proteínas Mal Plegadas

## Anexo II



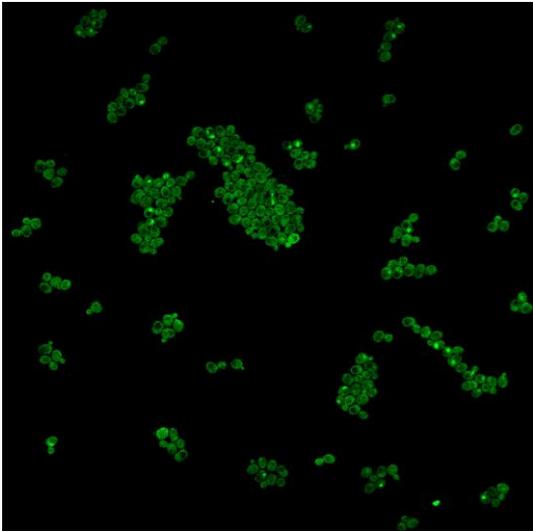
**La mutante nula de *CNB1* presenta un fenotipo extremo de sensibilidad a tunicamicina.** Ensayo de sensibilidad por goteo a ERE inducido por tunicamicina. Se comparó el fenotipo de las mutantes sencillas de *CNB1* y *CRZ1* con el del sensor de UPR *IRE1*. Tm: tunicamicina.

## Anexo III

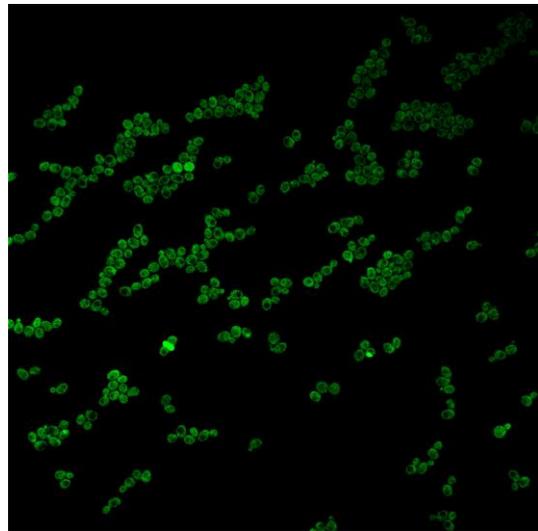


***Skp7p* y las distintas subunidades de Calcineurina se encuentran en vías separadas.** Ensayo de sensibilidad por goteo a ERE inducido por tunicamicina. Se compara el fenotipo de las mutantes dobles *cna2* $\Delta$ *skn7* $\Delta$  y *cnb1* $\Delta$ *skn7* $\Delta$  con el fenotipo de las mutantes sencillas. Tm: tunicamicina.

## Anexo IV



**4μg/mL Tm**



**4μg/mL Tm + 20mM EGTA**

**El cambio de localización de *CRZI-VENUS* disminuye en presencia de EGTA.** Localización de Crz1p en condiciones de ERE inducido por tunicamicina. Proyección máxima obtenida a partir de 10 imágenes colectadas desde el minuto 12 de inducción hasta el minuto 42. Tm: tunicamicina.

## Referencias

1. Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957 (2008).
2. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
3. 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).
4. Thewes, S. Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot. Cell* **13**, 694–705 (2014).
5. Pittman, J. K. Vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake. *Cell Calcium* **50**, 139–146 (2011).
6. Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455–62 (2008).
7. 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).

8. 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).
9. D’hooge, P. *et al.* Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Impact of ER/Golgi Ca<sup>2+</sup> storage. *Cell Calcium* **58**, 226–235 (2015).
10. Groenendyk, J., Lynch, J. & Michalak, M. Calreticulin, Ca<sup>2+</sup>, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cells* **17**, 383–9 (2004).
11. D’hooge, P. *et al.* Ca(2+) homeostasis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Impact of ER/Golgi Ca(2+) storage. *Cell Calcium* **58**, 226–35 (2015).
12. Prins, D. & Michalak, M. Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004069–a004069 (2011).
13. Michalak, M., Robert Parker, J. M. & Opas, M. Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* **32**, 269–78
14. Cunningham, K. W. Acidic calcium stores of *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Cell Calcium* **50**, 129–138 (2011).
15. Nigam, S. K. *et al.* A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. *J. Biol. Chem.* **269**, 1744–9 (1994).
  16. Lièvremont, J.-P., Rizzuto, R., Hendershot, L. & Meldolesi, J. BiP, a Major Chaperone Protein of the Endoplasmic Reticulum Lumen, Plays a Direct and Important Role in the Storage of the Rapidly Exchanging Pool of Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* **272**, 30873–30879 (1997).
  17. Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M. & Klausner, R. D. Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. *J. Cell Biol.* **114**, 189–205 (1991).
  18. Nakamura, K. *et al.* Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.* **154**, 961–72 (2001).
  19. Haigh, N. G. & Johnson, A. E. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J. Cell Biol.* **156**, 261–270 (2002).
  20. Strayle, J., Pozzan, T. & Rudolph, H. K. Steady-state free Ca<sup>2+</sup> in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly

- controlled by the secretory pathway pump Pmr1. *EMBO J.* **18**, 4733–4743 (1999).
21. Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J. M. & Thomas, D. Y. *Saccharomyces cerevisiae CNE1* Encodes an Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Protein with Sequence Similarity to Calnexin and Calreticulin and Functions as a Constituent of the ER Quality Control Apparatus. *J. Biol. Chem.* **270**, 244–253 (1995).
  22. Bonilla, M. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* **21**, 2343–2353 (2002).
  23. Olivares Resendiz, A. E. Papel del sistema de fosforrelevo de levaduras en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2017).
  24. Rusnak, F. & Mertz, P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483–521 (2000).
  25. 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).
  26. Fischer, M. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett.* **419**, 259–62 (1997).

27. Paidhungat, M. & Garrett, S. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca<sup>2+</sup> uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6339–47 (1997).
28. Muller, E. M., Locke, E. G. & Cunningham, K. W. Differential regulation of two Ca(2+) influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1527–38 (2001).
29. Carbó, N., Tarkowski, N., Ipiña, E. P., Dawson, S. P. & Aguilar, P. S. Sexual pheromone modulates the frequency of cytosolic Ca<sup>2+</sup> bursts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **28**, 501–510 (2017).
30. Thewes, S. Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot. Cell* **13**, 694–705 (2014).
31. Colinet, A.-S. *et al.* Yeast Gdt1 is a Golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation. *Sci. Rep.* **6**, 24282 (2016).
32. Chang, Y., Schlenstedt, G., Flockerzi, V. & Beck, A. Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1. *FEBS Lett.* **584**, 2028–2032 (2010).
33. Rigamonti, M. *et al.* Hypotonic stress-induced calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae* involves TRP-like transporters on the

- endoplasmic reticulum membrane. *Cell Calcium* **57**, 57–68 (2015).
34. Ohya, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Londesborough, J. & Anraku, Y. Two yeast genes encoding calmodulin-dependent protein kinases. Isolation, sequencing and bacterial expressions of CMK1 and CMK2. *J. Biol. Chem.* **266**, 12784–94 (1991).
  35. Stathopoulos, A. M. & Cyert, M. S. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**, 3432–44 (1997).
  36. Williams, K. E. & Cyert, M. S. The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *EMBO J.* **20**, 3473–83 (2001).
  37. Zhao, C. *et al.* Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1013–22 (1998).
  38. Polizotto, R. S. & Cyert, M. S. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J. Cell Biol.* **154**, 951–960 (2001).
  39. Thewes, S. Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot. Cell* **13**, 694–705 (2014).
  40. 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).
41. Li, S. The Eukaryotic Two-Component Histidine Kinase Sln1p Regulates OCH1 via the Transcription Factor, Skn7p. *Mol. Biol. Cell* **13**, 412–424 (2002).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
45. Lee, J. *et al.* Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 16040–6 (1999).
46. 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**, 1035–44 (1997).
47. Zhao, Y. *et al.* An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators. *Science* (80-. ). **333**, 1888–1891 (2011).
  48. Coe, H. & Michalak, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen. Physiol. Biophys.* **28 Spec No Focus**, F96–F103 (2009).
  49. Mizuno, T., Nakamura, M. & Irie, K. Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* **8**, 13078 (2018).
  50. 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).
  51. Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* (80-. ). **333**, 1891–1894 (2011).
  52. 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).