



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Participación de la cinasa MAP Hog1p en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina en *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Eunice Alejandra Domínguez Martín

edominguez@email.ifc.unam.mx

Dr. Roberto Coria Ortega

rcoria@ifc.unam.mx

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Dimitris Georgellis

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D. F. Enero, 2013



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

Reconocimientos	4
Resumen	5
Introducción.....	6
1. Las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	6
2. Hog1p es una MAPK que responde al estrés osmótico	7
2.1 La rama de Sho1p	8
2.2 La Rama de Sln1p.....	9
2.3 Hog1p efectúa acciones a corto y largo plazo en respuesta al estrés osmótico	10
3. Hog1 participa en la respuesta a otros estímulos	11
4. La Vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	12
5. Hog1p se requiere para responder a la tunicamicina	14
Hipótesis	16
Objetivo	16
Metodología	17
Resultados.....	21
1. Hog1p no se fosforila ante un tratamiento con tunicamicina	21
2. Análisis mediante microarreglos de los cambios ocasionados por la tunicamicina en los niveles de transcritos	22
2.1 La tunicamicina causa cambios en los niveles de transcritos de algunos genes que codifican para proteínas de las vías de MAP cinasas	23
2.2 Ante un tratamiento con tunicamicina la ausencia de Hog1p causa un desbalance en los niveles de transcritos de algunos genes	25
2.2.1 Vías de MAP cinasas.....	26
2.2.2 Ciclo celular	27
2.2.3 Procesos metabólicos.....	29
2.2.4 Genes que participan en otros procesos celulares	31
3. Factores de transcripción posiblemente implicados en los cambios transcripcionales que dependen de Hog1p en respuesta a la tunicamicina	33
4. La sobreexpresión de RER2 suprime el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$	37

Discusión	43
1. <i>Hog1p no se fosforila ante un tratamiento con tunicamicina</i>	43
2. <i>Análisis mediante microarreglos de los cambios ocasionados por la tunicamicina en los niveles de transcritos</i>	45
2.1.1 La tunicamicina causa cambios en los niveles de transcritos de algunos genes que codifican para proteínas de las vías de MAP cinasas	45
2.2 Ante un tratamiento con tunicamicina la ausencia de Hog1p causa un desbalance en los niveles de transcritos de algunos genes	46
3. <i>RER2 suprime el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$</i>	48
Conclusiones	54
Bibliografía.....	55

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega en el laboratorio 302 oriente, del Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la colaboración del Dr. Roberto Coria del Departamento de Genética Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos reportados en esta tesis.

Se reconoce especialmente, la asesoría técnica de la Dra. Laura Kawasaki, quien brindó apoyo fundamental para la realización de los experimentos reportados en esta tesis; así como la asesoría del Dr. Francisco Torres Quiroz. Ambos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce también la colaboración de los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Dimitris Georgellis del Departamento de Genética Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM; y el Dr. Ismael Bustos, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

También se reconoce la asesoría y apoyo de la Dra. Laura Ongay, de la Lic. María Guadalupe Códiz y de la Mtra. Minerva Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, así como a los miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, en particular al Mtro. Gerardo Coello.

La realización de este proyecto fue apoyado por DGAPA, UNAM, PAPIIT No. IN206513 y CONACyT, CB No. 166734

El Jurado para el examen de grado estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Jorge Nieto Sotelo

Secretario: Dra. Rosa Estela Navarro González

Vocal: Dr. Jesús Aguirre Linares

Vocal: Dr. Luis Servín González

Vocal: Dr. Diego González Halphen

RESUMEN

En *Saccharomyces cerevisiae*, Hog1p es la cinasa activada por mitógenos (MAPK) encargada de regular la respuesta celular ante un aumento en la osmolaridad, y resulta indispensable para que esta levadura pueda sobrevivir a la tunicamicina (Tn) y a otras condiciones de estrés.

La tunicamicina es un antibiótico que evita la adición de las primeras unidades de glucosamina fosfato al dolicol fosfato, al inhibir a la UDP-N-acetil-glucosamina-1-P transferasa (Alg7p). Este antibiótico es utilizado como inductor de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), ya que al evitar el primer paso de la N-glicosilación interfiere con el plegamiento de las proteínas y ocasiona una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE). A pesar de que una mutante carente de Hog1p es sensible a la Tn, su respuesta UPR no está alterada.

En este trabajo se analizó el papel de Hog1p en la respuesta a la tunicamicina mediante un análisis de los cambios en la expresión génica. Para esto se utilizó un microarreglo. Los resultados muestran que se requiere de Hog1p para que sucedan algunos de los cambios en los niveles de transcritos que se generan en respuesta a la tunicamicina. Dentro de los genes cuya expresión depende de Hog1p se encuentran algunos de la misma vía de HOG, así como genes que dependen de otras vías de MAPKs. La tunicamicina induce también genes que codifican para proteínas ribosomales y para proteínas involucradas en procesos metabólicos, así como genes que codifican para proteínas que participan en la regulación del ciclo celular.

Se realizó también una búsqueda de los genes cuya sobreexpresión suprime el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de una cepa mutante nula de Hog1p. Se encontró que la sobreexpresión de Rer2p, cis-prenil transferasa encargada del primer paso de formación del dolicol, es capaz de suprimir la falta de Hog1p. El dolicol es el acarreador de los residuos de sacáridos requeridos para la modificación de las proteínas en el RE. Esto sugiere que Hog1p se requiere para regular la síntesis del dolicol, el cual se requiere para generar una respuesta de protección a la tunicamicina.

INTRODUCCIÓN

1. LAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKS)

Las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs por las siglas en inglés: Mitogen Activated Kinases) son una familia de proteínas altamente conservadas entre especies eucariontes que se caracterizan por regular la respuesta a estímulos extracelulares como factores de crecimiento, citocinas y algunos tipos de estrés. Al ser activadas, regulan a otras enzimas, a proteínas del citoesqueleto, a reguladores de la traducción y también a factores de transcripción. La forma en que las MAPKs controlan a otras proteínas es mediante fosforilación de residuos de serinas o treoninas. La fosforilación suele ocurrir en un motivo conservado en el que se encuentra una serina o una treonina seguida de una prolina (Edmunds & Mahadevan 2004).

Las cinasas MAP se encuentran en el último nivel de una cascada de fosforilación que permite que se activen en respuesta a un estímulo. Los eventos que disparan la cascada de fosforilación suelen ser acontecimientos extracelulares o que suceden al nivel de la membrana o pared celular tales como la ocupación de un receptor por su ligando, el cambio en la turgencia de la membrana celular, perturbaciones en la estructura de la pared celular, etc.

El estímulo externo lleva a la activación del primer componente de la cascada de fosforilación, la cinasa de la cinasa de la MAPK (MAPKKK o MEKK), la cual al activarse fosforila al siguiente componente de la cascada, a la cinasa de la MAPK (MAPKK o MEK) en residuos de serina o treonina. A su vez la MAPKK fosforila a la MAPK en residuos de treonina y de tirosina. Este sitio de fosforilación de la MAPK suele estar en el asa de regulación de esta proteína, y en algunos casos, esta

modificación ocasiona que la MAPK se transfiera al núcleo, en donde lleva a cabo parte de su actividad.

Las MAPKs ocasionan varios cambios en la célula dependiendo del tipo de estímulo al que responden. Por ejemplo, pueden ocasionar modificaciones en el metabolismo, cambios en la actividad transcripcional y traduccional de la célula, en la progresión del ciclo celular, así como también en el remodelamiento de la morfología celular (Biondi & Nebreda 2003; de Nadal *et al.* 2002).

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco MAPKs que regulan diversos procesos celulares como el apareamiento en respuesta a feromona (Fus3p y Kss1p), el crecimiento invasivo y formación de hifas (Kss1p), la respuesta al daño en la pared celular (Slp2p), la esporulación (Smk1p) y la respuesta al estrés osmótico (Hog1p) (Qi & Elion 2005).

Algunas de estas cinasas están altamente conservadas. Una de estas es p38, la cual es homóloga de la cinasa Hog1p de la levadura *S. cerevisiae* (Caffrey *et al.* 1999). Hog1p está involucrada en la respuesta al aumento en la osmolaridad del medio externo. Mientras su homóloga en mamíferos, p38, además de participar en respuesta al estrés osmótico, está involucrada en la respuesta a otros estímulos como el estrés por irradiación con UV y la presencia de lipopolisacáridos (Han *et al.* 1994).

2. HOG1P ES UNA MAPK QUE RESPONDE AL ESTRÉS OSMÓTICO

En la levadura, la activación de la MAPK Hog1p en respuesta al estrés osmótico depende de dos ramas. Ambas ramas activan a la misma MAPKK mediante diferentes MAPKKKs. Una de estas es la rama de Sho1p, la cual depende de la activación de la MAPKKK Ste11p mediante una proteína G pequeña. Mientras la

otra, la de Sln1p, regula a su vez a dos MAPKKKs redundantes Ssk2 y Ssk22 mediante un sistema de fosforrelevo (de Nadal *et al.* 2002) (Ver fig. 1).

2.1 LA RAMA DE SHO1P

La activación de Hog1p mediante la rama de Sho1p se desencadena mediante varios procesos complejos que suceden a nivel de la membrana plasmática. Esta rama utiliza como sensores a dos proteínas tipo mucinas: Msb2p y Hkr1p, las cuales participan en activar a la proteína de andamiaje Sho1p y a la cinasa de la familia PAK, Ste20p (p21 Activated Kinase) (Tatebayashi *et al.* 2007). Una vez activada Sho1p, es capaz de interactuar con Pbs2p, una proteína de andamiaje y MAPKK de Hog1p (Maeda *et al.* 1995).

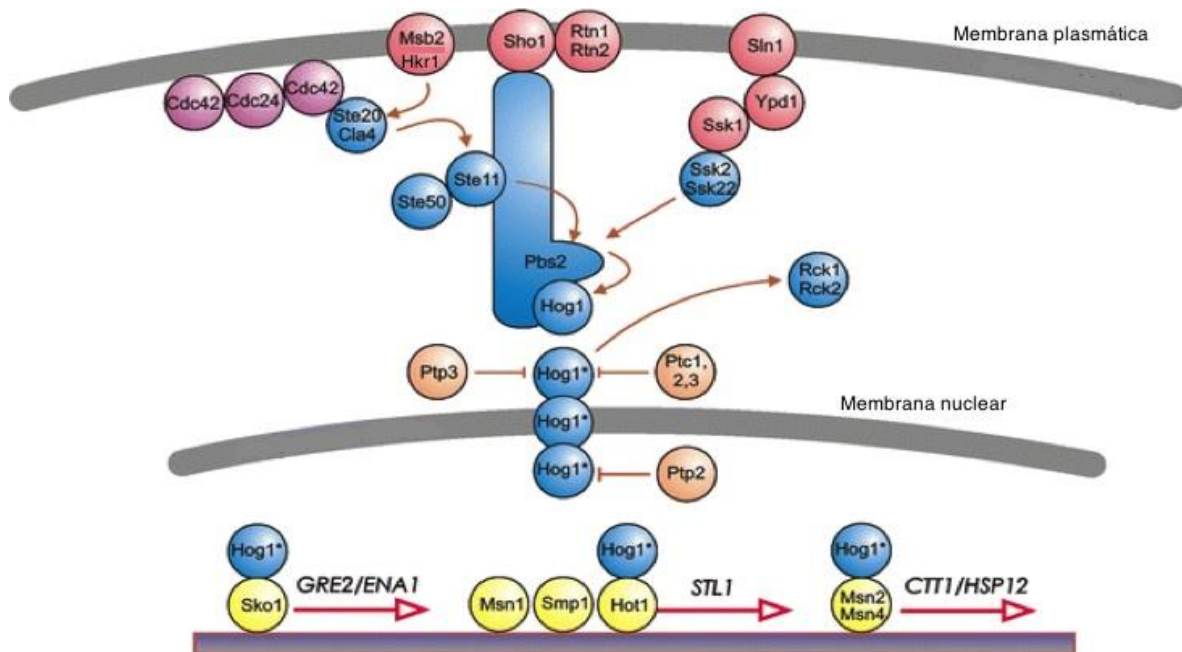


Figura 1. La vía de respuesta al estrés osmótico (vía de HOG) en *S. cerevisiae*. La activación de la MAPK Hog1p es desencadenada por dos ramas. La rama de Sho1p permite la activación de la MAPKKK Ste11p, mientras que la rama del fosforrelevo activa a las MAPKKK Ssk2p y Ssk22p. Cuando Hog1p está activa regula a proteínas citoplasmáticas, como Rck1/2, y se transporta al núcleo en donde regula a factores de transcripción, remodeladores de la cromatina y a la RNA polimerasa. De esta forma controla la expresión génica (tomada de Krantz *et al.* 2006).

La cascada de fosforilación de esta rama la inician la cinasa Ste20p y la GTPasa Cdc42p, la cual permite llevar a la membrana a Ste20p (Raitt *et al.* 2000). Al aumentar la osmolaridad en el medio, Ste20p activa por fosforilación a Ste11p, la MAPKKK de esta rama; esto desencadena la activación de Hog1p mediante Pbs2p (Posas *et al.* 1998)

2.2 LA RAMA DE *SLN1P*

Como se mencionó anteriormente, otra de las ramas que activan a Hog1p depende de un sistema de fosforrelevo. Los sistemas de fosforrelevo son parte de los mecanismos celulares de señalización que responden a diferentes estímulos ambientales y se basan en la transferencia de fosfatos entre una histidina y un aspartato (Maeda *et al.* 1994).

Los sistemas de fosforrelevo están básicamente constituidos por una cinasa de histidinas que al sentir el estímulo se autofosforila, y una proteína reguladora de respuesta, encargada de ejercer la respuesta celular. También, existen sistemas con múltiples pasos de fosfotransferencia. Estos se encuentran más comúnmente en organismos eucariontes, como es el caso del sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae*.

El sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* tiene tres componentes: la cinasa de histidinas Sln1p, la fosfotransferasa que contiene histidina Ypd1p y el regulador de respuesta Ssk1p (Ota & Varshavsky 1992; Ota & Varshavsky 1993; Li *et al.* 1998). Los cambios en la turgencia de la membrana plasmática regulan la configuración y actividad de Sln1p (Fassler & West 2010). En la vía de HOG, este sistema ejerce un control negativo sobre la activación de la MAPK Hog1p. En condiciones de osmolaridad favorables para el crecimiento de la levadura, este sistema de

fosforrelevo mantiene un estado basal de fosforilación modesta que disminuye al aumentar la osmolaridad en el medio externo.

Un aumento en la osmolaridad ocasiona que se detenga la trans-autofosforilación de Sln1p, y por lo tanto el flujo de fosfatos al resto de los componentes del sistema de fosforrelevo. Entonces, al encontrarse el regulador de respuesta Ssk1p defosforilado, interactúa con Ssk2p/Ssk22p. Esto estimula la autofosforilación y activación de estas MAPKKs que desencadenan la cascada de fosforilación que activa a Hog1p mediante Pbs2p (Posas *et al.* 1998).

2.3 HOG1P EFECTÚA ACCIONES A CORTO Y LARGO PLAZO EN RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO

Cuando está activa la MAPK Hog1p, efectúa varias acciones que protegen a la célula del aumento en la osmolaridad externa. Para contrarrestar los efectos a corto plazo, Hog1p estimula el flujo de iones de sodio al exterior mediante la fosforilación del antiportador Nha1p y del canal de potasio Tok1p (Proft & Struhl 2004). Otra acción a corto plazo es la regulación del flujo de glicerol al exterior mediante la fosforilación del canal exportador de glicerol Fps1p (Thorsen *et al.* 2006).

La mayor parte de las moléculas de Hog1p activadas se transportan al núcleo, en donde controlan la expresión de casi 600 genes de respuesta al estrés osmótico (O'Rourke & Herskowitz 2004). Dentro de los genes que aumentan su expresión se encuentra Slt1p, sistema que importa glicerol al interior de la célula de forma activa (Posas *et al.* 2000). Además, aumenta la expresión de las enzimas glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (codificada por los genes *GPD1* y *GPD2*) y glicerol-3-fosfatasa (codificada por los genes *GPP1* y *GPP2*). Estas contribuyen a que aumente la producción de glicerol intracelular (Rep *et al.* 1999). Hog1p controla la expresión de estos y otros genes, modificando a activadores y represores transcripcionales,

ya sea mediante fosforilación o directamente interactuando con ellos. Además, puede promover la remodelación de la cromatina y contribuye a reclutar a la RNA-polimerasa II (Mas *et al.* 2009; Proft & Struhl 2002).

Otra de las acciones en las que participa Hog1p para permitir a la célula recuperarse del estrés es la interrupción del ciclo celular. Hog1p fosforila a Sic1p, proteína reguladora de la progresión de G1 a S, lo cual evita su degradación y ocasiona un arresto en la fase G1 del ciclo celular (Escoté *et al.* 2004).

3. HOG1 PARTICIPA EN LA RESPUESTA A OTROS ESTÍMULOS

Además del papel vital que juega Hog1p en la respuesta al estrés osmótico, existen evidencias de que esta MAPK se requiere en otros procesos celulares. Algunos de estos procesos parecen depender sólo de una de las ramas que alimentan a la vía HOG. Por ejemplo, se ha descrito que Hog1p se activa en respuesta a estrés por calor de forma dependiente de Sho1p (Winkler *et al.* 2002). También se ha reportado que mediante esta rama, Hog1p está involucrada en la respuesta al tratamiento con zimoliasa, en la cual participa junto con la MAPK Slt2p (Bermejo *et al.* 2008; García *et al.* 2009).

Se ha observado que la respuesta que Hog1p efectúa ante otros estímulos es diferente a la forma en que lo hace ante el estrés osmótico. Por ejemplo, ante un tratamiento con zimoliasa o con tunicamicina, no se requiere que se transporte al núcleo (Bermejo *et al.* 2008; Torres-Quiroz *et al.* 2010). Sin embargo, parece ser que el aumento en la concentración intracelular de glicerol dependiente de Hog1p sí juega un papel en la respuesta a otros tipos de estrés, como se observó en el caso de la respuesta al blanco de calcoflúor y a la tunicamicina (García-Rodríguez *et al.* 2000; Torres-Quiroz *et al.* 2010). Se ha reportado también, que Hog1p participa en aspectos relacionados con la viabilidad, o tiempo cronológico de vida de la

célula; acción que parece ejercer mediante la regulación del metabolismo del glicerol (Kaeberlein *et al.* 2002).

Estos estudios sobre el papel de la MAP cinasa Hog1p aún no han sido concluyentes y falta discernir más claramente cuál es el papel que juega en la regulación de éstos y otros procesos celulares.

4. LA VÍA DE RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR)

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que Hog1p participa en respuesta al tratamiento con tunicamicina (Tn). Este es un antibiótico nucleosídico que impide la N-glicosilación en el retículo endoplásmico (RE), pues es un inhibidor de la enzima UDP-N-acetil-glucosamina-1-P transferasa Alg7p. Esta cataliza la transferencia de N-acetil glucosamina-1-fosfato al dolicol fosfato. A su vez, el N-acetilglucosaminil-dolicol-difosfato es la base del oligosacárido que será transferido a las proteínas que requieren ser glicosiladas.

Cuando estas proteínas no se glicosilan, tampoco pueden plegarse correctamente, por lo que se quedan acumuladas en el RE y no pueden ser transportadas a su destino final en la célula. A esta situación se le conoce como estrés de retículo endoplásmico.

La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE provoca que se active la vía de la UPR (De las siglas en inglés de: Unfolded Protein Response). El sensor de esta vía es Ire1p, una cinasa transmembranal de serinas y treoninas residente en el RE, que se encuentra acoplada a la proteína Kar2p. Ésta, por su lado es una chaperona de respuesta a estrés calórico o Hsp70 (De las siglas en inglés de: 70 kilodalton Heat shock protein), que asiste en el proceso de plegamiento de las proteínas en el lumen del retículo endoplásmico.

Cuando Kar2p se asocia a las proteínas mal plegadas libera un dominio de Ire1p, lo cual permite que pueda asociarse para formar oligómeros y trans-autofosforilarse (Todd-Corlett *et al.* 2007). Además, Ire1p contiene un dominio similar al complejo mayor de histocompatibilidad mediante el cual une péptidos mal plegados. Esto estimula su actividad de cinasa (Oikawa *et al.* 2007).

Al trans-autofosforilarse, Ire1p desenmascara su dominio citoplasmático de endonucleasa. Con este dominio, procesa al RNA mensajero del factor de transcripción Hac1p (ver fig. 2). Específicamente, Ire1p escinde un intrón no canónico que evita la traducción de este RNA mensajero. De esta forma aumenta la concentración de Hac1p, el cual regula la expresión de chaperonas y otras proteínas involucradas en mantener la homeostasis del RE (Sidrauski & Walter 1997).

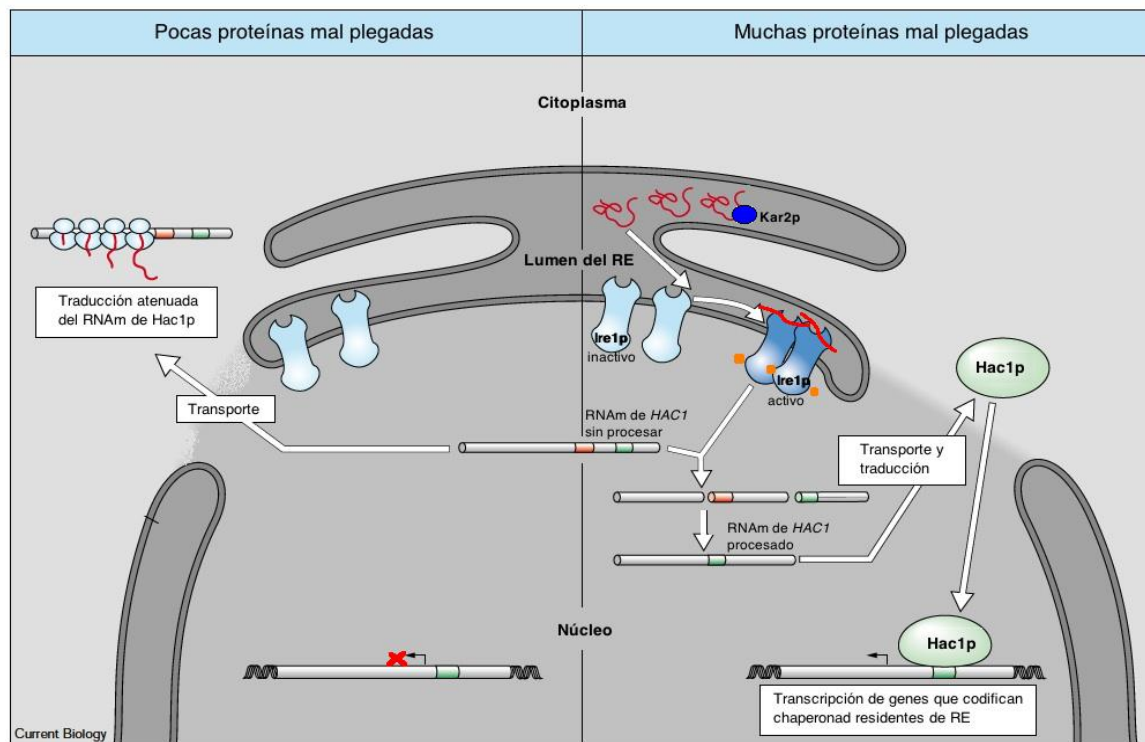


Figura 2. La vía de respuesta a proteínas mal plegadas. Las proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico son detectadas por la chaperona Kar2p y por Ire1p. Esto enciende la actividad de cinasa de Ire1p, permitiendo que se trans-autofosforile. Ire1p procesa al mRNA de Hac1p. Este último es un factor transcripcional que promueve la transcripción de los genes requeridos para contener con el estrés (Modificada de Ron & Walter 2007).

5. HOG1P SE REQUIERE PARA RESPONDER A LA TUNICAMICINA

Recientemente se reportó que la ausencia tanto de la MAPKK Pbs2p, como de Hog1p, ocasionan un fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina (Chen *et al.* 2005; Torres-Quiroz *et al.* 2010). También, se observó que algunos de los componentes que forman parte de la vía HOG parecen estar involucrados en la respuesta a este estrés (Ver Fig. 3A), aunque aún no es claro el papel que juegan ni la forma en que participan.

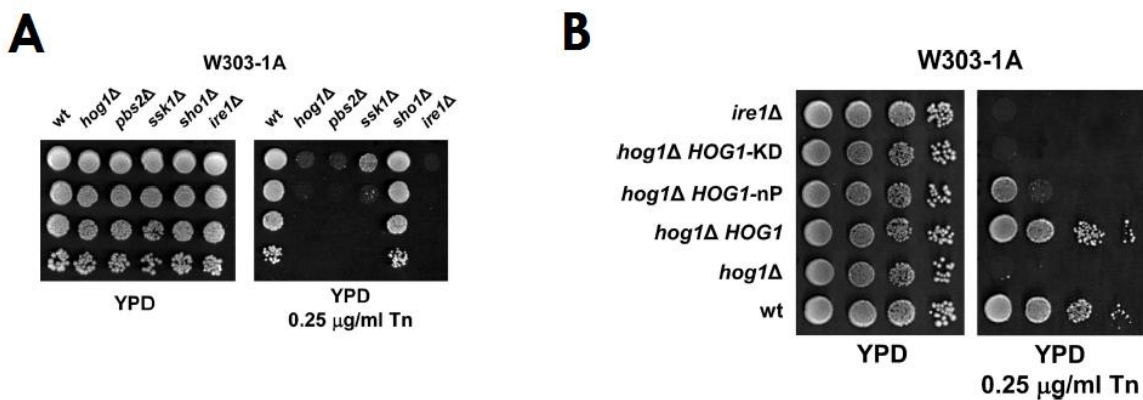


Figura 3. A) La mutante nula de Hog1p es sensible a la tunicamicina. Ensayo por goteo de sensibilidad a la tunicamicina de varias mutantes de la vía de HOG y de una mutante de *Δire1*. **B)** La actividad de cinasa de Hog1p es indispensable para sobrevivir a la tunicamicina. Ensayo por goteo de sensibilidad a la tunicamicina de una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una forma de Hog1p que no se puede fosforilar (*hog1ΔHOG1-nP*) o una mutante sin actividad de cinasa (*hog1Δ HOG1-KD*) (Modificado de Torres-Quiroz *et al.* 2010).

En el trabajo de Torres-Quiroz y colaboradores del 2010, se observó que ante un tratamiento con tunicamicina Hog1p no requiere fosforilarse ni trasladarse al núcleo, a diferencia de lo que sucede en respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, es indispensable que se mantenga intacto el dominio de cinasa (Fig. 3B). Una cepa en la que se expresa una versión mutante de *hog1* sin actividad de cinasa, la cual contiene una mutación (lisina 52 por arginina) en el sitio catalítico, es tan sensible a la tunicamicina como una mutante nula *Δhog1*. Además, la actividad que realiza

Hog1p en respuesta a la tunicamicina parece ser independiente de la vía de UPR, pues en este trabajo no se observaron cambios ni en el procesamiento de Hac1p, ni en la expresión de los genes que este regula. La actividad que efectúa Hog1p es específica para responder al efecto de este antibiótico, puesto que las mutantes nulas de Hog1p y de Pbs2p no muestran sensibilidad a otros inductores de estrés de RE como la 2-desoxiglucosa.

Sin embargo, todavía no se han estudiado los mecanismos mediante los cuales Hog1p participa en la protección de las células contra la tunicamicina, ni se tiene certeza de que realmente Hog1p esté participando en el proceso de respuesta a estrés de retículo endoplásmico.

HIPÓTESIS

Los procesos regulados por la cinasa Hog1p ante un tratamiento con tunicamicina son esenciales para que la célula sobreviva a este antibiótico. Sin embargo, Hog1p no se fosforila y no se transporta al núcleo ante un tratamiento con tunicamicina. Proponemos que en presencia de tunicamicina, Hog1p regula procesos celulares citoplasmáticos, algunos relacionados directamente con la respuesta al estrés ocasionado por la tunicamicina y otros capaces de regular cambios transcripcionales.

OBJETIVO

Estudiar la participación de la MAP cinasa Hog1p en la respuesta a la tunicamicina y específicamente, caracterizar si participa en la regulación de la expresión génica ante este tratamiento. Así como identificar genes cuya sobreexpresión es capaz de suprimir el fenotipo sensible a la tunicamicina de una mutante nula *Δhog1*.

METODOLOGÍA

Cepas utilizadas

BY4741 *WT*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0

BY4742 *Δ hog1*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *hog1::kanMX4*

BY4742 *Δ hsc82*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *hsc82::kanMX4*

BY4742 *Δ hsp82*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *hsp82::kanMX4*

BY4742 *Δ skn7*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *skn7::kanMX4*

BY4742 *Δ erd1*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *erd1::kanMX4*

BY4741 *Δ ire1*: Mata his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 *ire1::kanMX4*

Medios y condiciones de cultivo.

Las levaduras se crecieron a 30^o C en el medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa al 2%) o en medios sintético definido (base nitrogenada sin aminoácidos 0.18%, glucosa 2%), suplementado con una mezcla de aminoácidos que posibilita el crecimiento de las células y mantiene la selección de los plásmidos: sulfato de adenina, L-triptofano, L-histidina, L-Arginina y L-metionina (cada uno 20 mg/ml); L-tirosina, L-isoleucina y L-lisina (cada uno 30 mg/ml); Leucina, L-ácido glutámico, y L-ácido aspártico (cada uno 100 mg/ml); L-treonina 200 mg/ml, y L-serina 400 mg/ml.

Para inducir la expresión de los genes clonados en el plásmido pYES2 se utilizó medio YPGal o Sgal. Ambos contienen los mismos ingredientes que el medio YPD y SD, pero en vez de glucosa se adicionan sólo con galactosa al 2%.

E. coli se creció en medio LB suplementado con ampicilina 50mg/L o kanamicina, según el marcador de selección.

Para los ensayos en caja de sensibilidad a la tunicamicina, se gotearon diluciones seriales de un cultivo crecido toda la noche, cuya densidad óptica se ajustó a 1.0 a 600nm.

Plásmidos utilizados

Se utilizó una biblioteca genómica de *S. cerevisiae*, contenida en el plásmido *pGP654*, provista por *Open Biosystems*. Este plásmido contiene el marcador de selección *LEU2* y las secuencias del plásmido 2 micras que son necesarias para mantener un alto número de copias. La biblioteca se construyó mediante digestión parcial del genoma de *S. cerevisiae* con la enzima de restricción *MboI*, de forma que están contenidos fragmentos de aproximadamente 10 Kb. Los genes no se encuentran etiquetados y su expresión depende de su propio promotor.

Para sobreexpresar por separado los genes que suprimieron el fenotipo sensible a la tunicamicina de *hog1*, se utilizó el plásmido de expresión inducible por galactosa *pYES2*. Todos los productos de PCR obtenidos se clonaron en el plásmido pGEM-T-easy.

Oligonucleótidos utilizados

Para amplificar los genes analizados por *northern blot* se utilizaron los pares de oligonucleótidos de la colección *Yeast Gene PAIRS* provista por *Research Genetics, Huntsville, AL*.

Para amplificar los genes NTH2 y RER2 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

NTH2fw: –GGATCCCAAAGTTAATATTCG–

NTH2rv: –TCTAGAATATTACTGAGGCAC–

RER2fw: –AAGCTTACACTTCTTGTGTTG–

RER2rv: –GGATCCTATGCCATGTGG–

Extracción de RNA para microarreglo y *northern blot*

Se trataron cultivos de las cepas estudiadas durante 60 minutos con tunicamicina 2µg/ml o con el mismo volumen pero de DMSO. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 5000 RPM, a 4°C, y se les extrajo RNA total mediante la técnica de fenol ácido caliente. Para probar la integridad de las muestras se visualizaron mediante electroforesis desnaturalizante en agarosa con formaldehído y formamida.

El análisis de los niveles de transcritos mediante microarreglos, se llevó a cabo en la *Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular*. Se utilizó un microarreglo de doble canal y se analizaron 6 529 genes.

Para análisis tipo *northern blot*, se transfirió el RNA a una membrana de PDVF por capilaridad, y se hibridó en buffer SSC 4X (NaCl 0.6M, citrato de sodio 0.1M) a 50°C, durante 12 horas con una sonda específica para el gen deseado.

Para el gen *HSC82* se utilizó como sonda el fragmento que comprende del codón de inicio (ATG) al primer sitio que reconoce la enzima *Eco RI* en la base 596. Para el gen *DOG2* se utilizó el amplificado del gen completo (740 pb).

Ensayos de inmunodetección (*western blot*)

Se trataron cultivos en fase exponencial (OD₆₀₀ 0.5) con NaCl 0.4M por cinco minutos, o con tunicamicina a 2µg/ml por diferentes tiempos. Antes de tomar cada muestra, se ajustó la densidad óptica a 0.5 para tener la misma cantidad de células en todas las condiciones. Las muestras se fijaron por diez minutos con TCA al 85% después de ser tratadas. Este medio se retiró y las muestras se lavaron PBS. Para lisar las células se utilizaron perlas de vidrio y amortiguador de carga para SDS-PAGE. Se quitaron las perlas para lisis por centrifugación y se recuperó el sobrenadante. Se analizó el mismo volumen de cada uno de estos extractos totales de proteína por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nylon.

La membrana se bloqueó con leche al 9% en PBS y Tween al 0.05%, por treinta minutos a temperatura ambiente, posteriormente el anticuerpo contra la forma fosforilada de P-38 se adicionó en esta solución y se incubó a 4°C toda la noche. Se lavó la membrana en PBS con tween al 1% y se incubó con anticuerpo secundario durante una hora. De igual manera se lavó y se incubó con sustrato por cinco minutos, después de lo cual, se expuso con una placa fotográfica. Para el análisis con anticuerpo contra Hog1p total se siguió el mismo procedimiento. Se utilizó la misma membrana después de haber sido tratada con SDS y β -mercaptoetanol para quitar por completo los anticuerpos usados anteriormente.

Búsqueda de genes cuya sobreexpresión suprime el fenotipo sensible a la tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$

Se transformó la cepa $\Delta hog1$ con una genoteca de *S. cerevisiae*, que contiene su genoma completo clonado en fragmentos de aproximadamente 10 Kb en el sitio *BamHI* en el plásmido pGP564 (provista por *Thermo Scientific Open Biosystems*).

Las transformantes se crecieron en placas de medio selectivo (SD-LEU) adicionado con tunicamicina 1 μ g/ml o en ese mismo medio sin tratamiento. Las colonias que crecieron en medio con tunicamicina se estriaron nuevamente en medio selectivo con y sin tunicamicina para corroborar su fenotipo. De estas se seleccionaron nuevamente las cepas que crecieron tan eficientemente en tunicamicina como la cepa silvestre.

De las transformantes que fueron capaces de crecer en tunicamicina, se extrajo el plásmido supresor y se transformó en *E. coli* para purificarlo y caracterizarlo mediante digestión. Los plásmidos que mostraron diferentes patrones de digestión se utilizaron para transformar la cepa $\Delta hog1$ y se seleccionaron los que fueron capaces de suprimir el fenotipo de esta cepa en tunicamicina. De estos se

secuenció el fragmento clonado y se identificó mediante BLAST en la base de datos genómicos de *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org).

RESULTADOS

1. HOG1P NO SE FOSFORILA ANTE UN TRATAMIENTO CON TUNICAMICINA

Con el objetivo de comprobar si Hog1p se fosforila en respuesta a la tunicamicina, durante tiempos más largos que los que se analizaron anteriormente por Torres-Quiroz *et al.* (2010), se realizó un ensayo de inmunodetección (*western blot*) en el que se utilizó un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de Hog1p.

Se incubaron células durante 30, 60, 120 y 180 minutos con tunicamicina a una concentración de 2µg/ml. Como puede observarse en la figura 5, no se observó fosforilación de Hog1p aún a tiempos largos de tratamiento con Tunicamicina (Tn), mientras que con un tratamiento con NaCl a 0.4M, esta cinasa se fosforiló desde los 5 minutos. Esta observación coincide con el reporte de Torres-Quiroz y colaboradores (Ver Fig.4).

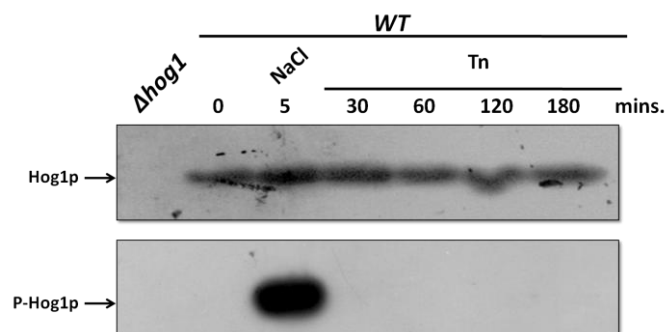


Figura 5. Análisis de la Fosforilación de Hog1p. *Western blot* contra Hog1p (panel superior) o contra la forma fosforilada de esta proteína. Se analizaron extractos totales de proteína de células tratadas con NaCl 0.4M por 5 minutos, o con tunicamicina (Tn) 2µg/ml durante los tiempos señalados.

2. ANÁLISIS MEDIANTE MICROARREGLOS DE LOS CAMBIOS OCASIONADOS POR LA TUNICAMICINA EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS

Para determinar los efectos que ocasiona el tratamiento con tunicamicina sobre los niveles de transcritos, así como las consecuencias que tiene la ausencia de la MAPK Hog1p sobre éstos, se analizó mediante un microarreglo el nivel de RNA de todos los genes en condiciones de crecimiento con y sin antibiótico. Para esto, se trataron cultivos tanto de la cepa silvestre, como de la cepa $\Delta hog1$, con tunicamicina 2 μ g/ml o con el vehículo en que esta se disuelve (DMSO) durante una hora. Se utilizó esta concentración de antibiótico, pues es suficiente para inducir la respuesta UPR. Esto se corroboró mediante un análisis tipo *northern blot* contra el RNA mensajero de *HAC1*, en el cual se observó que el RNA mensajero de *HAC1* ya estaba procesado (dato no mostrado).

Se extrajo el RNA total de las células tratadas con vehículo o con tunicamicina y se analizaron ambas condiciones en dos microarreglos independientes de doble canal (*WT* vs $\Delta hog1$ con DMSO, y *WT* vs $\Delta hog1$ con Tn a 2 μ g/ml). Los resultados obtenidos fueron analizados y clasificados con el programa GENARISE (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/main.html>). Las listas de genes que se obtuvieron se depuraron, para conservar sólo los genes cuya diferencia en la expresión entre ambas condiciones fuera igual o mayor a 1.5 veces, y fueron analizadas para encontrar las rutas metabólicas y procesos celulares que se ven afectados en las diferentes condiciones. Para realizar estos análisis se utilizaron los programas en línea DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) y YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>). Las categorías arrojadas con estos programas fueron revisadas, curadas a mano y graficadas.

Los datos arrojados por el análisis de los niveles de transcritos mediante un microarreglo mostraron posibles cambios en la expresión de genes en las diferentes condiciones utilizadas. Sin embargo, con esta técnica no es posible saber si las diferencias observadas fueron resultado de cambios en las tasas de transcripción, o si se deben a diferencias en los procesos de degradación de los transcritos, o a una suma de ambos.

2.1 LA TUNICAMICINA CAUSA CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE ALGUNOS GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS DE LAS VÍAS DE MAP KINASAS

Al analizar los genes cuyos niveles de transcritos cambiaron debido a un tratamiento con tunicamicina en la cepa silvestre, se observó que existen 2059 genes cuya expresión aumenta más de 1.5 veces y 569 que muestran una disminución de la misma magnitud.

Se observó que hubo cambios en los niveles de transcritos de varios genes que codifican para proteínas involucradas en las vías de señalización de MAPKs. Como puede observarse en la figura 6, la abundancia de los transcritos de varios genes que participan en la vía de respuesta al estrés osmótico es mayor ante un tratamiento con tunicamicina. Dentro de estos se encuentran algunos de los genes que codifican para componentes del sistema de fosforrelievo (*SLN1*, *YPD1* y *SSK2*), el gen que codifica para la MAPKK de esta vía *PBS2* y el de uno de los factores de transcripción de esta vía *MSN4*.

Varios componentes de la vía que responde a daños en la pared (Vía de la PKC o choque hipotónico) también presentaron este comportamiento.

También se incrementó la expresión del gen para la MAP cinasa *KSS1*, y del factor de transcripción *STE12*, ambos componentes de la vía de crecimiento filamentoso.

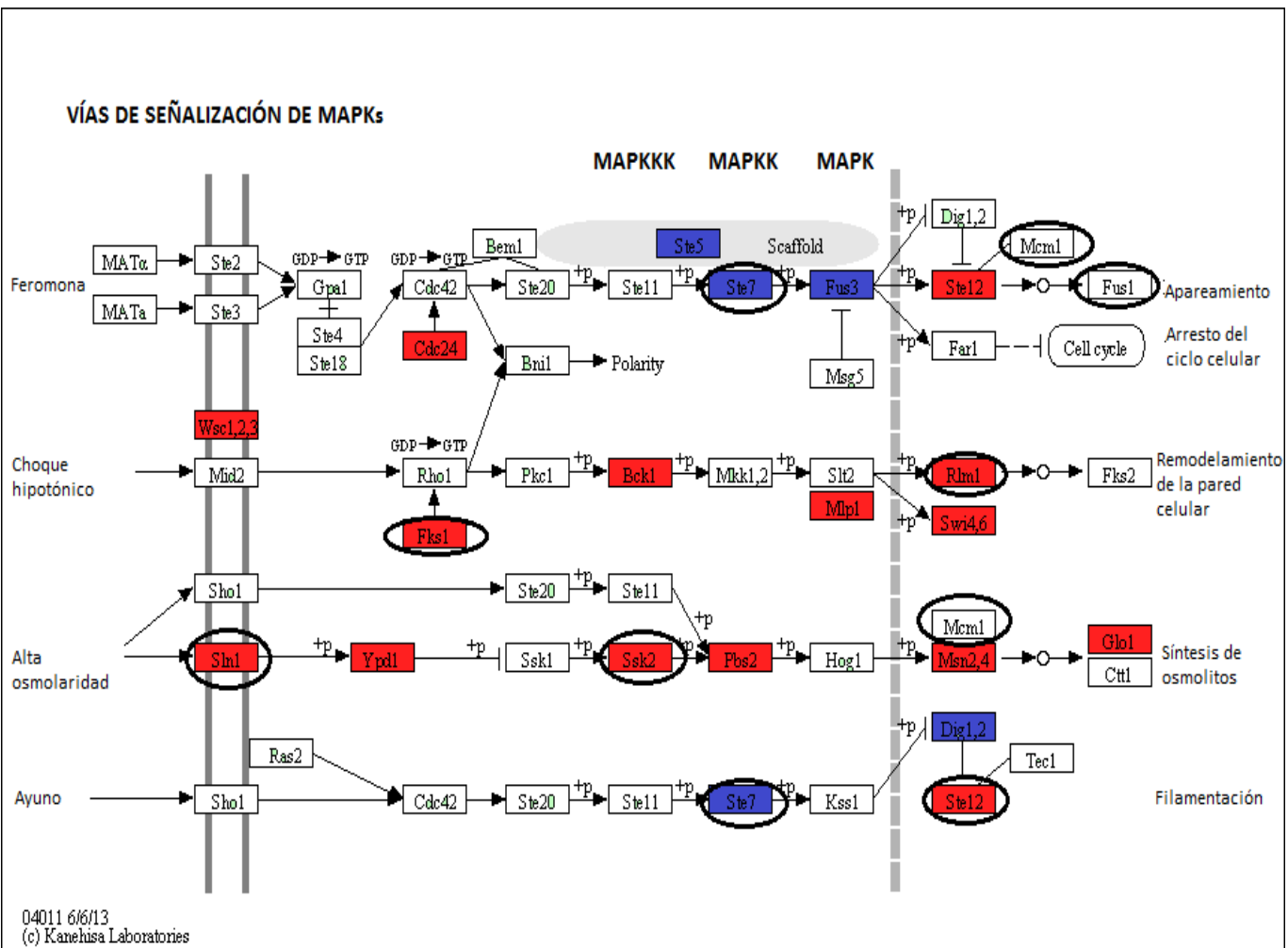


Figura 6. Genes cuyo nivel de transcritos cambió ante un tratamiento con tunicamicina. Se muestran los genes cuyo nivel de transcritos cambió en una cepa *WT* ante un tratamiento con tunicamicina (1hr, 2µg/ml). En color rojo los genes en los que aumentó y en azul en los que disminuyó. Encerrados en un círculo se muestran los genes cuya abundancia de transcritos es diferente en la cepa *hog1* ante un tratamiento con tunicamicina (Figura obtenida de la base de datos de KEGG y modificada con los datos obtenidos del análisis informático).

Como era esperado, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en el plegamiento y transporte de proteínas.

Dentro de los genes que disminuyeron su expresión, podemos distinguir varios que genes que codifican para proteínas de la vía de respuesta a feromona. Dentro de estos, se encuentran el gen que codifica para la MAPKK de esta vía (*STE7*), el de la proteína de andamiaje (*STE5*) y el de la MAPK (*FUS3*); además del gen de un regulador transcripcional de esta vía (*DIG1*) que actúa al regular negativamente la vía de crecimiento filamentoso. Anteriormente se ha reportado que ante un aumento en la osmolaridad Hog1p ejerce un control negativo sobre la vía de respuesta a feromona (O'Rourke & Herskowitz 1998); los datos aquí reportados podrían estar relacionados con estas observaciones, y sugerir que ante un tratamiento con tunicamicina existe una regulación transcripcional negativa de la vía de feromona.

Se observó también una disminución en la expresión de genes que participan en la transcripción, en la replicación del genoma y en algunos procesos metabólicos.

Además, se observaron cambios en la expresión de genes que participan en la fosforilación oxidativa y en la construcción de la base proteica de los ribosomas.

2.2 ANTE UN TRATAMIENTO CON TUNICAMICINA LA AUSENCIA DE HOG1P CAUSA UN DESBALANCE EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE ALGUNOS GENES

Al comparar los niveles de transcritos de células de la cepa $\Delta hog1$ tratadas con tunicamicina, contra los niveles de la cepa silvestre, se observó que existen varios procesos biológicos que se vieron afectados por la ausencia de esta cinasa. Dentro de estos, 76 genes disminuyeron su expresión más de 1.5 veces en la cepa $\Delta hog1$ ante un tratamiento con tunicamicina, y 15 aumentaron esta proporción.

2.2.1 Vías de MAP cinasas

Al analizar la abundancia de los transcritos de los genes de las vías de MAPKs se observó que algunos de los genes cuya expresión cambió ante un tratamiento con tunicamicina en la cepa silvestre (Ver Figura 6 y 7), muestran un comportamiento diferente en la cepa $\Delta hog1$. Dentro de estos se encontraron genes que codifican para componentes de la vía de HOG, específicamente dos genes para proteínas que participan en el sistema de fosforrelevo muestran un nivel de transcrito más de 1.5 veces mayor que la cepa silvestre. Estos son *SLN1*, que codifica la histidín cinasa de este sistema, y *SSK2*, que codifica para una de las MAPKKK de la vía de HOG.

Este comportamiento se pudo observar también en genes para componentes de la vía de feromona, como *STE7* y *FUS1*. Este último, suele inducirse en respuesta a feromona y participa en los eventos de polarización que se requieren para la fusión celular. Previamente se ha observado que al tratar mutantes nulas $\Delta hog1$ con estrés osmótico se puede generar una comunicación cruzada entre la vía de feromona y la vía de HOG, que desencadena un aumento en la expresión de *FUS1* (O'Rourke & Herskowitz 1998). Es posible pensar que se está generando un efecto similar al utilizar tunicamicina. Además, se observó que aumentó el gen para uno de los factores de transcripción de esta vía, *MCM1*.

Respecto a la vía de respuesta a daños en la pared celular se observó que hay un decremento en los niveles de dos genes (*ROM1* y *FKS1*) que codifican para proteínas que regulan a Rho1p (GTPasa que regula a la Pkc1p). Se afectó también la expresión del gen que codifica para uno de los factores de transcripción de esta vía: *RLM1*.

Se ha reportado que Hog1p participa en regular la vía de integridad de la pared celular mediada por la PKC ante un tratamiento con zimoliasa (García *et al.* 2009; Bermejo *et al.* 2008), y dado que la tunicamicina puede afectar la formación de algunos componentes de la pared, es posible que Hog1p juegue un papel en la

regulación de estos genes ante el daño que este antibiótico ejerce en la pared celular.

2.2.2 Ciclo celular

Dentro de los genes que codifican para proteínas que participan en el ciclo celular se observó que 11 presentaron un comportamiento diferente en el nivel de transcritos ante un tratamiento con tunicamicina en la cepa *Δhog1* con respecto a la cepa silvestre. Dentro de los que disminuyó su nivel se encontró a *MCM2*, gen para una proteína involucrada en la replicación; a *SMC3*, gen para una proteína que participa en el mantenimiento y segregación de cromosomas; y a *MEC1*, que codifica para una proteína de que revisa la integridad cromosomal, entre otros (Figura 7).

Figura 7. Mapa de color de los genes que mostraron un menor nivel de transcrito en la cepa *Δhog1* con respecto a la *WT* ante un tratamiento con tunicamicina. Se muestra para cada gen una breve descripción de la proteína que codifica y el promedio de los valores de fluorescencia que se obtuvieron en el microarreglo.



DMSO		TN		
WT	<i>Δhog1</i>	WT	<i>Δhog1</i>	
388.40	299.00	125.00	19.00	PRM2
311.98	225.62	269.80	137.40	ROM1
4311.90	6070.70	994.50	523.00	FKS1
897.20	1046.10	1537.60	902.20	HOR7
738.50	662.00	2385.69	1646.15	RLM1
1132.80	1327.90	138.10	60.70	NDT80
421.10	383.00	225.40	127.40	NBP1
541.10	682.70	415.00	272.20	SMC3
329.60	324.40	2251.60	1280.10	BMH1
313.30	254.00	2100.20	1302.50	TUP1
1829.50	1611.40	2259.00	1417.40	MEC1
265.00	215.50	14217.80	8554.40	GIN4
965.10	982.90	25587.10	14736.10	MCM2
9962.30	16486.20	168.80	88.50	CSE4
951.20	923.00	499.40	322.50	HHF2
285.50	235.60	39514.90	25878.00	SAS4
121.00	71.40	242.00	136.30	YGK3
206.00	165.50	243.00	144.00	PHO12
99.00	76.90	221.00	153.40	INO1
110.70	113.50	474.40	167.50	ADE17
136.20	145.90	296.30	168.60	SQS1
147.00	120.70	319.30	171.00	NCR1
496.50	489.50	332.20	192.00	SPE2
291.60	275.60	332.40	193.40	AAD15
270.50	261.80	417.10	227.50	TAL1
680.50	571.00	434.70	242.50	ALG6
130.90	116.60	440.50	269.00	MDH3
169.60	173.60	1195.00	529.00	GLK1
139.90	131.00	2296.00	1151.70	CPR1
207.00	169.40	3670.00	2786.50	ITR1
117.00	80.80	33355.20	20986.80	PMP1

MAPKs

Proteína regulada por feromona.

Proteína de intercambio de GDP/GTP para Rho1p.

Subunidad catalítica de la 1,3-beta-D-glicano sintasa.

Gen cuya transcripción se induce ante estrés osmótico.

Factor de transcripción activado por Slt2p que participa en mantener la integridad celular.

Ciclo celular

Factor de transcripción específico de la meiosis.

Componente del huso acromático.

Subunidad del complejo multiproteico de cohesina.

Proteína 14-3-3

Represor general de la transcripción.

Proteína de revisión de integridad del genoma.

Cinasa envuelta en la gemación y en el crecimiento del anillo de septina.

Proteína envuelta en la replicación del DNA.

Cromatina

Proteína centromérica similar con la histona H3.

Histona H4.

Acetilasa de histonas libres y nucleosomas.

Metabolismo

Cinasa relacionada a las cinasas de sintasas de glucógeno GSK-3

Fosfatasa ácida.

Sintetasa de inositol-3-fosfato.

Enzima que participa en la biosíntesis de purinas.

Proteína que estimula la actividad de ATPasa y helicasa de Prp43p

Proteína involucrada en el metabolismo de esfingolípidos.

Decarboxilasa S-adenosilmetionina.

Aril-alcohol deshidrogenasa.

Transladolasa de la vía de las pentosas.

Alfa 1,3 glicosiltransferasa.

Malato deshidrogenasa peroxisomal.

Glucocinasa.

Peptidil-prolil cis-transisomerasa citoplásmica.

Transportador de mio-inositol.

Subunidad regulatoria de la ATPasa membranal H (+) Pma1p

2.2.3 Procesos metabólicos

Dentro de los genes que codifican para proteínas que participan en procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa, la formación de la estructura proteica del ribosoma y la síntesis de glicanos se observó que los niveles de transcritos fueron diferentes en la cepa *Δhog1* ante un tratamiento con tunicamicina.

Dentro de estos procesos metabólicos cabe señalar la síntesis de lípidos. Uno de ellos fue el ergosterol, pues se observó un aumento en los niveles de transcritos de genes que participan en su síntesis (*ERG12*, *ERG28* y *ERG4*). Este lípido forma parte de las membranas celulares de hongos y algunas plantas, y se sintetiza en la membrana del RE, de donde es transportado a la membrana plasmática. Ahí juega un papel importante en la regulación de la rigidez, fluidez y permeabilidad de esta membrana. Debido a la gran importancia que tiene este esteroide en el funcionamiento de la membrana celular, es el blanco de la mayoría de las terapias antifúngicas.

Dentro de los genes cuyo nivel disminuyó (Fig.7), se observaron algunos que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos (*YGK 3*, *GLK1*), así como en la síntesis de inositol (*INO1*, *ITR1*). Se observaron también genes que codifican para proteínas que participan en la función de la mitocondria (*QCR6*, *ATP2*, *MIC17*) y algunas para componentes del ribosoma (*RP33*, *RPL32*, *TIF6*) (Ver Fig. 8)



DMSO		TN		
WT	<i>Δhog1</i>	WT	<i>Δhog1</i>	
286.10	244.60	640.10	336.50	ATP2
438.50	409.60	7965.30	4713.80	MIC17
29752.90	31236.10	10637.80	6795.00	QCR6
318.00	274.00	954.50	559.30	RPL32
216.20	190.10	3486.40	2425.00	RPS3
285.70	244.40	23863.50	12176.70	TIF6
282.40	224.50	296.50	155.10	ENP1
268.50	246.50	293.00	156.50	SAD1
199.15	175.08	287.80	167.20	ELP4
1204.25	1605.98	514.10	245.50	GRS1
514.30	603.80	3846.60	1755.90	NAM8
276.90	227.50	337.00	170.90	VPS54
304.50	257.50	440.50	239.50	PDR5
329.90	314.50	461.00	241.00	TOM70
704.50	593.00	623.60	334.30	SMF1
412.80	380.00	951.80	530.50	NUP1
319.00	284.20	3023.70	1578.00	SMY2
9362.10	6555.90	212.40	105.30	HSF1
434.50	375.40	348.05	214.35	ERD1
806.90	825.80	888.90	430.00	HSC82
222.50	198.40	1028.40	707.00	HSP82

Mitocondria

Subunidad beta del sector F1 de la ATP sintasa.

Proteína del espacio intermembranal de la mitocondria.

Subunidad de la ubiquinol citocromo C-reductasa.

Ribosoma

Componente de la subunidad pequeña del ribosoma pequeño (40s).

Componente de la subunidad pequeña del ribosoma pequeño (40s).

Proteína del las partículas 66s preribosomales.

tRNA y otros tipos de RNA

Proteína asociada a los snoRNAs U3 y U14.

Proteína envuelta en el procesamiento de pre mRNA.

Subunidad de la ATPasa E1p456 requerida para modificar tRNAs.

Sintasa de glicil-RNA.

Proteína de unión a RNA que forma parte del snRNP del complejo de procesamiento de mRNA.

Transporte

Componente del complejo de transporte retrógrado de proteínas a Golgi.

Transportador tipo ABC.

Componente del sistema de transporte TOM.

Transportador de iones.

Proteína que forma parte del poro nuclear.

Proteína que participa en la formación de vesículas COPII.

Chaperonas

Factor de transcripción de respuesta a estrés calórico.

Proteína requerida para retener en el RE algunas proteínas.

Chaperona citoplasmática de la familia Hsp90.

Chaperona de la familia Hsp90.

Figura 8. Mapa de color de los genes que mostraron un menor nivel de transcrito en la cepa *Δhog1* con respecto a la *WT* ante un tratamiento con tunicamicina. Se muestra para cada gen una breve descripción de la proteína que codifica y el promedio de los valores de fluorescencia que se obtuvieron en el microarreglo.

2.2.4 Genes que participan en otros procesos celulares

Se observó otro grupo de genes que mostraron diferencias en la abundancia de transcritos en la cepa $\Delta hog1$, los cuales codifican para proteínas que participan en respuesta a algunos tipos de estrés. Dentro de los genes cuya expresión disminuyó se encuentran algunas chaperonas. En este grupo se encuentra el gen que codifica para la chaperona citosólica *HSC82* (Fig. 8), la cual participa en la respuesta a calor y además juega un papel clave en la activación de proteínas reguladoras y de señalización (Picard 2002).

Se encontraron también al gen para el factor de transcripción de respuesta a estrés por calor *HSF1* y al de la fosfatasa de 2-Deoxiglucosa- 6- fosfato (*2-DOG*). Esta proteína ayuda a la célula a recuperarse de un tratamiento con 2-DOG (Fig.9), análogo de la glucosa que, además de inducir la UPR, genera efectos metabólicos. Este gen aumenta su expresión en respuesta a estrés oxidativo y al estrés osmótico (Randez-Gil *et al.* 1995).

Se observaron también diferencias en el perfil de transcritos de algunos genes que participan en otros procesos como el transporte de iones o de proteínas y el procesamiento de tRNAs y mRNAs (Fig.8), así como varios genes que codifican para proteínas de función desconocida (Fig.9).



DMSO		TN			
WT	<i>Δhog1</i>	WT	<i>Δhog1</i>		
224.50	214.20	227.40	112.50	HUL5	Factor E4 del complejo de ensamblaje de ubiquitina.
2152.90	2398.70	265.00	129.50	DOG2	Fosfatasa de 2-deoxiglucosa-6-fosfato. Se induce por el estrés osmótico y oxidativo.
206.50	173.00	329.40	192.50	ATX2	Proteína envuelta en la homeostasis del manganeso.
390.90	302.80	404.20	210.30	FMP33	Proteína de función desconocida.
290.70	250.00	559.40	244.10	ECM3	Proteína de función desconocida.
312.30	314.80	444.50	258.50	FLO9	Proteína tipo lectina que participa en la floculación.
348.00	281.50	508.20	307.50	YML133C	Proteína de función desconocida
1594.90	1703.60	851.50	319.00	HAP1	Factor de transcripción que regula la expresión génica dependiendo de los niveles de oxígeno.
312.00	283.50	1219.10	679.40	SET6	Proteína de función desconocida.
242.90	257.50	3070.70	1772.30	CWP1	Manoproteína de la pared celular.
117.70	145.10	18488.60	10672.00	DIF1	Proteína que regula la localización nuclear de Rnr2p y Rnr4p
421.00	362.70	23758.70	12167.70	PAU18	Proteína de función desconocida.
3727.80	3719.80	27833.70	13336.50	FMP41	Proteína de función desconocida.
4820.00	7228.60	23996.10	14694.80	GIR2	Proteína de función desconocida.
352.30	293.40	32807.20	17222.10	COS8	Proteína de la membrana nuclear. Posiblemente participa en la UPR.

Figura 9. Mapa de color de los genes que mostraron un menor nivel de transcrito en la cepa *Δhog1* con respecto a la *WT* ante un tratamiento con tunicamicina. Se muestra para cada gen una breve descripción de la proteína que codifica y el promedio de los valores de fluorescencia que se obtuvieron en el microarreglo.

Para comprobar los datos obtenidos en el microarreglo, también se analizó mediante *northern blot* los niveles de transcritos del gen para la chaperona *HSC82* y para la fosfatasa *DOG2* (Fig.10). Se eligieron estos genes debido al papel que juegan en la respuesta a estrés. Se utilizó como control el nivel del mensajero *ACT1* el cual codifica a la actina, esto debido a que se observó en el microarreglo que este transcrito se mantiene sin variación en las diferentes condiciones evaluadas.

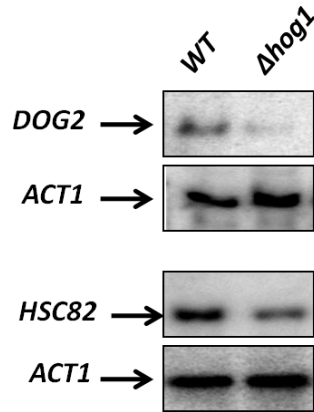


Figura 10. Análisis mediante *northern blot* de genes cuyo nivel de transcritos es menor en la cepa $\Delta hog1$ ante un tratamiento con tunicamicina. Parte superior: hibridación de una misma membrana con una sonda contra *DOG2* o *ACT1*. Parte inferior: hibridación de una misma membrana con una sonda contra *HSC82* o *ACT1*. RNA total de la cepa WT o $\Delta hog1$ tratadas 1hr. con Tn 2 μ g/ml.

Como puede observarse en la figura 10, los niveles de los transcritos de *DOG2* y de *HSC82* efectivamente se vieron disminuidos en la cepa $\Delta hog1$ en comparación con la cepa silvestre ante un tratamiento con tunicamicina. Esto muestra que la presencia de Hog1p es necesaria para regular la expresión de genes implicados en la respuesta al tratamiento con este antibiótico, y sugiere que el fenotipo de sensibilidad que muestra la cepa carente de esta cinasa, puede deberse a defectos en la expresión de este tipo de genes implicados.

3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN LOS CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES QUE DEPENDEN DE HOG1P EN RESPUESTA A LA TUNICAMICINA

Los datos previos reportados por Torres-Quiroz *et al.* (2010) muestran que Hog1p no es transportada al núcleo cuando la levadura se trata con tunicamicina, por lo que esta cinasa difícilmente podría estar actuando directamente como regulador

transcripcional. Así que si esta cinasa participa regulando cambios transcripcionales posiblemente lo hace regulando directa o indirectamente la actividad de factores de transcripción.

Para esto, se analizaron las listas de genes que mostraron diferencias en sus niveles de transcritos en una cepa *Δhog1* en comparación con la cepa silvestre ante un tratamiento con tunicamicina. Se utilizó la herramienta *RANK BY TF* contenida en la página WEB *www.yeabstract.com*. Esta herramienta puede ejecutar dos tipos de análisis. Uno de ellos en base a significancia estadística, y el otro mediante las posibles redes de regulación contenidas en la lista de genes analizados.

Tipo de Análisis	Reguladores positivos	
Estadístico	Spt23p	Regulador de la síntesis de ácidos grasos insaturados. Se localiza en la membrana del RE. Es activado mediante proteólisis de su extremo N-terminal. Presenta un gen parálogo: <i>MGA2</i> (Chellappa <i>et al.</i> 2001).
	Hmo1p	Proteína HMG-box, participa en la transcripción de genes ribosomales y en el mantenimiento del genoma (Gadal <i>et al.</i> 2002)
	Ifh1p	Coactivador que participa en la transcripción de proteínas ribosomales. Tiene un gen parálogo: <i>CRF1</i> (Schawalder, SB. 2004).
Participación en la red de regulación	Rap1p	Activador/represor esencial. Participa en la estructura y mantenimiento de los telómeros (Morse 2000).
	Ste12p	Factor de transcripción que se activa por la vía de MAP cinasas de respuesta a feromona (Dolan <i>et al.</i> 1989)

Tabla 1. Factores que posiblemente regulan positivamente la expresión de genes de forma dependiente de Hog1p ante un tratamiento con Tn.

Al analizar la lista de genes cuyo nivel es mayor en la cepa silvestre que en la *Δhog1* en condiciones de crecimiento con tunicamicina (ver Tabla 1 para más detalles), mediante el análisis de significancia estadística se obtuvieron un total de 288

factores de transcripción que son capaces de regular positivamente la expresión al menos de uno de los genes. Dentro de estos, tres de ellos tienen una probabilidad aceptable de ser reguladores transcripcionales ($p < 2 \times 10^{-4}$): Spt23p, Hmo1p y Ifh1p. Cuando se emplea el análisis de participación en la red de regulación se observa que los factores de transcripción con mayor peso en la red son Rap1p y Ste12p (weight >5).

En el caso de los genes cuyo nivel disminuye en la cepa $\Delta hog1$ ante el tratamiento con este antibiótico (ver Tabla 2 para mayor detalle), mediante el análisis estadístico, se obtuvieron un total de 262 posibles reguladores negativos de la expresión. Sin embargo, sólo uno cumple con una probabilidad aceptable de actuar como regulador transcripcional ($p = 1.8 \times 10^{-4}$), Sas4p. Al utilizar el análisis de red de regulación, se observa también a Ste12p, junto con Abf1p y Sok2p (Weight >5).

Tipo de Análisis	Reguladores negativos	
Estadístico	Sas4p	Regulador del silenciamiento génico. Subunidad del complejo SAS, que acetila histonas libres y nucleosomas (Xu <i>et al.</i> 1999).
Participación en la red de regulación	Abf1p	Proteína de unión a DNA con posible actividad de reorganizadora de la cromatina.
	Sok2p	Regulador Negativo del crecimiento de pseudohifas. Juega un papel regulatorio en la vía de la PKA (Ward <i>et al.</i> 1995).
	Ste12p	Factor de transcripción que se activa por la vía de MAP cinasas de Respuesta a feromona (Dolan <i>et al.</i> 1989).

Tabla 2. Factores que posiblemente regulan negativamente la expresión de genes de forma dependiente de Hog1p ante un tratamiento con Tn.

Para ampliar los datos informáticos obtenidos, se probó el fenotipo de algunas mutantes nulas de factores de transcripción que ya se ha reportado que presentan algún tipo de interacción con Hog1p y que se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo. Dentro de las cepas analizadas, se observó que únicamente la mutante nula $\Delta skn7$ presentó sensibilidad a la tunicamicina (Fig. 11); aunque no

mostró tanta sensibilidad como la mutante nula de $\Delta hog1$. Este factor de transcripción forma parte del sistema de fosforrelevo que activa a Hog1p en respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, no participa en la respuesta a un aumento en la osmolaridad, sino que más bien en respuesta a daños ocasionados en la pared celular (Brown *et al.* 1994).

Las observaciones aquí reportadas sugieren que este factor de transcripción está implicado en la respuesta a la tunicamicina, y existe la posibilidad de que Hog1p sea un regulador de este factor de transcripción. Anteriormente se había reportado que Skn7p participa en la respuesta a estrés oxidativo, y ante este estímulo requiere ser activado por otras vías de forma independiente del sistema de fosforrelevo (He *et al.* 2009).

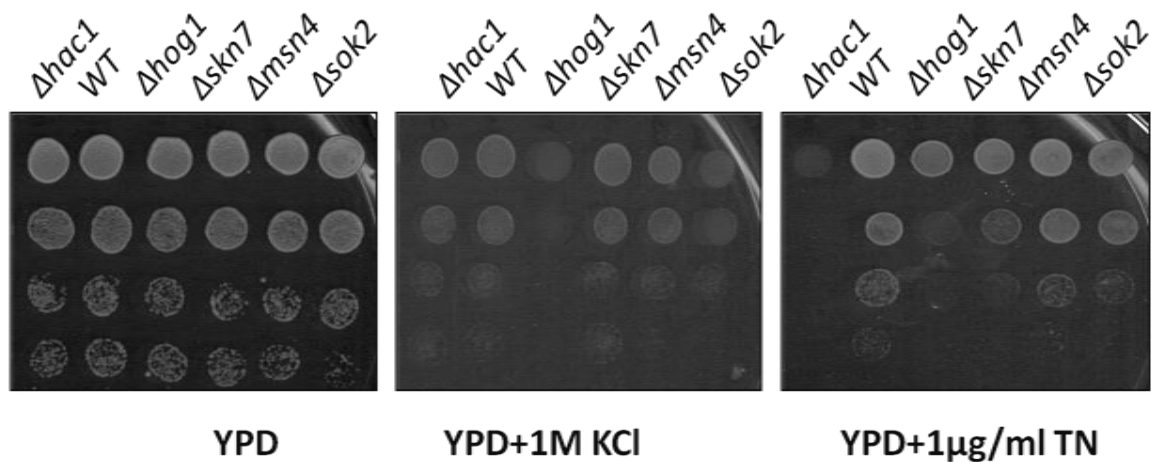


Figura 11. Fenotipo de mutantes nulas de algunos factores de transcripción que podrían ser regulados por Hog1p. Ensayo de goteo para analizar el fenotipo de sensibilidad al estrés osmótico (1M KCl) o a la tunicamicina (1µg/ml Tn) de cepas mutantes nulas de diferentes factores de transcripción.

4. LA SOBREENPRESIÓN DE *RER2* SUPRIME EL FENOTIPO DE SENSIBILIDAD A LA TUNICAMICINA DE LA CEPA Δ HOG1

Otra estrategia para encontrar blancos de Hog1p en respuesta a Tn fue buscar genes cuya sobreexpresión suprimiera la sensibilidad de una mutante nula Δ hog1. Para esto, se transformó la cepa Δ hog1 con una genoteca, la cual contiene el genoma completo de *S. cerevisiae* clonado en fragmentos de aproximadamente 10 Kb en el sitio *Bam*HI del plásmido multicopia *pGP564*.

Las transformantes se crecieron en placas de medio selectivo (SD-LEU) adicionado con tunicamicina (1µg/ml) o en ese mismo medio sin tratamiento. Se obtuvieron aproximadamente 25,000 colonias en las placas sin tunicamicina y 32 colonias en el medio con este antibiótico.

Las 32 colonias que crecieron en presencia de tunicamicina se estriaron en medio selectivo con y sin tunicamicina. Para corroborar los fenotipos observados, se estriaron y se volvieron a seleccionar las cepas que crecieron tan eficientemente en tunicamicina como la cepa silvestre. De éstas se extrajo el plásmido supresor y se transformó *E. coli* para poder purificarlo y caracterizarlo mediante digestión con la enzima de restricción *Eco*RI.

Posteriormente, se transformó la cepa Δ hog1 con los plásmidos que mostraron diferentes patrones de digestión y se probó, mediante ensayos por goteo, el fenotipo de tres clonas independientes transformadas con cada plásmido.

De estos plásmidos tres suprimieron el fenotipo sensible a la tunicamicina de la cepa Δ hog1, por lo que se secuenció su inserto (Fig. 12).

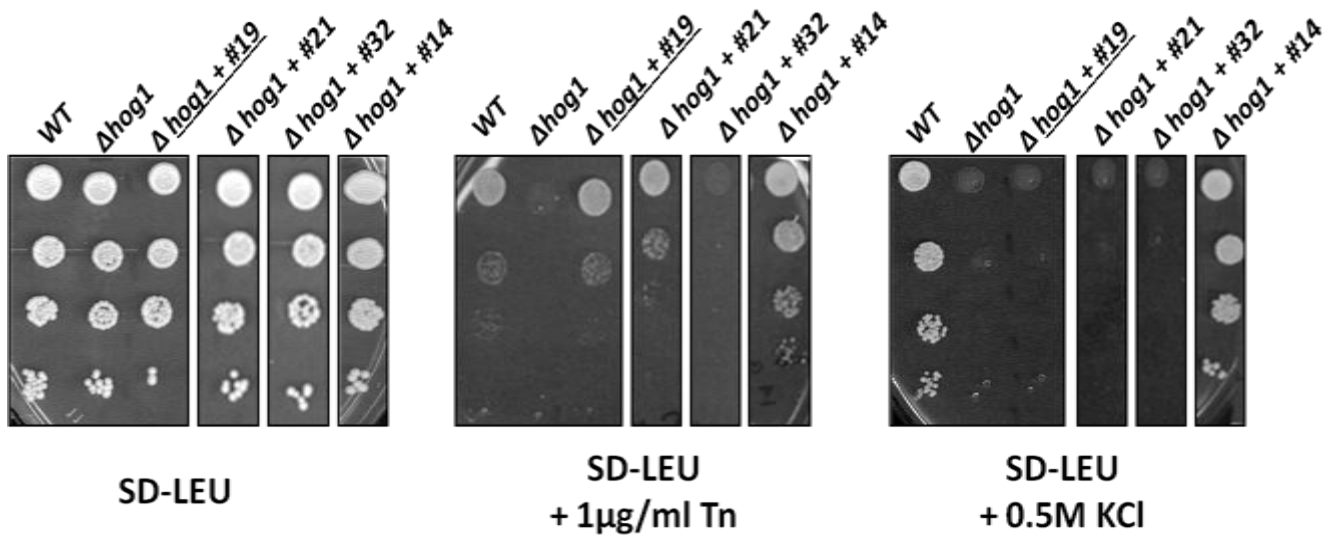


Figura 12. Transformantes de la cepa $\Delta hog1$ con plásmidos que contienen fragmentos génicos cuya sobreexpresión suprimió el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de ésta cepa. Ensayos de goteo para observar la sensibilidad al estrés osmótico (KCl 0.5M) o a la tunicamicina (1µg/ml) de diferentes transformantes de la mutante $\Delta hog1$ con diferentes plásmidos (#19, #21, #32, #14) cuyo inserto contiene posibles regiones genómicas cuya sobreexpresión suprimió el fenotipo sensible a la tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$.

De estos tres plásmidos, dos contuvieron regiones génicas diferentes. Uno de ellos, (#14) contiene un fragmento del cromosoma en el que se encuentra el gen *HOG1* con su promotor, por lo que se descartó. Otro de ellos (#32) no tuvo ningún producto clonado, por lo que también se descartó.

El plásmido #19, contuvo una región génica del cromosoma II (Ver Fig. 13), en la que se encuentran seis genes completos y la región centromérica (ChrII:231,128 a 243,960). De estos genes, dos codifican para las histonas Hta2p y Htb2p. Otro para Coq1p, que cataliza el primer paso de la síntesis de Coenzima Q. También se encuentra un gen pequeño no esencial de función desconocida (*ECM15*) y el gen para la trealasa *NTH2*, la cual parece estar implicada en la tolerancia al estrés calórico y podría estar implicada en la respuesta a otros tipos de estrés. En esta región también se encuentra *RER2*, que codifica para una cis-preniltransferasa

implicada en la síntesis de dolicol, que además parece intervenir en retención y reciclamiento de proteínas del RE.

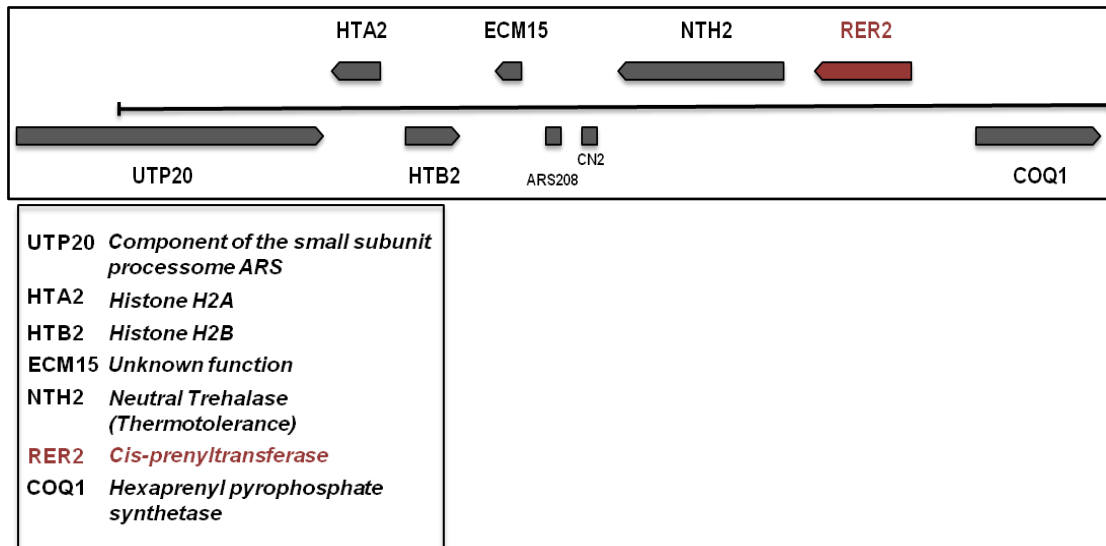


Figura 13. Región génica de *S. cerevisiae* (ChrII: 231,128 a 243,960) que se encuentra clonada en el plásmido supresor #19.

Con el objetivo de probar si la supresión del fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina que el plásmido #19 confiere a la $\Delta hog1$ es específica para esta cepa, se transformó otra cepa que presenta sensibilidad a este antibiótico. Se eligió la cepa mutante nula $\Delta hac1$, factor de transcripción de la vía de UPR, y se probó mediante un ensayo de goteo. Como puede observarse en la figura 14, la expresión del plásmido supresor #19 sólo fue capaz de aliviar el fenotipo de sensibilidad a Tn de la cepa $\Delta hog1$ y no de la $\Delta hac1$, lo cual indica que la supresión efectivamente fue específica para el fenotipo que ocasiona la ausencia de *HOG1* ante este tratamiento.

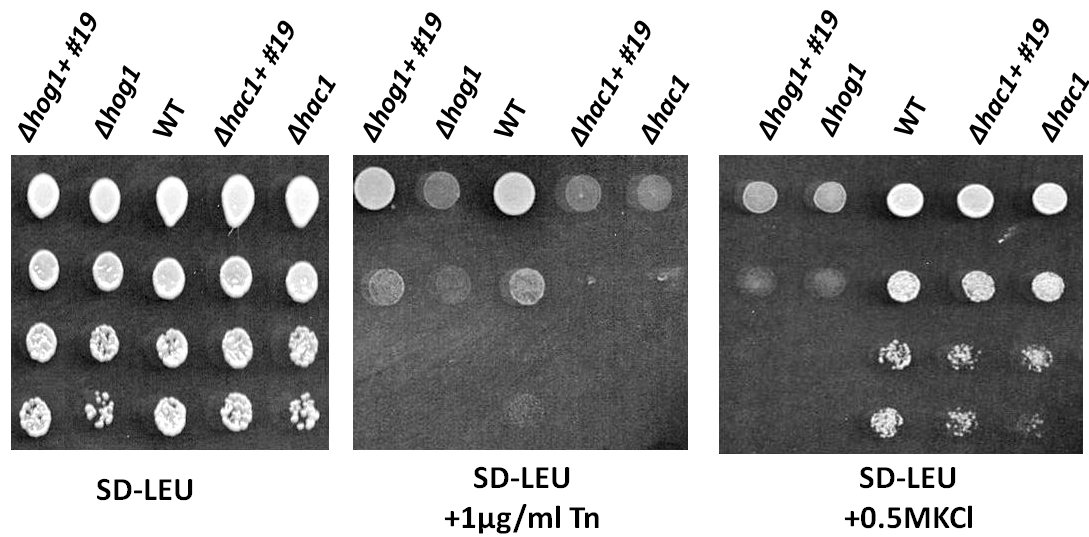


Figura 14. El plásmido #19 suprimió la sensibilidad a Tn de la cepa $\Delta hog1$ y no de la $\Delta hac1$. Ensayo de goteo para analizar el fenotipo de sensibilidad al estrés osmótico (1M KCl) o a la tunicamicina (1µg/ml Tn) de las cepas: $\Delta hog1$ y $\Delta hac1$ transformadas con el plásmido supresor #19 o con el plásmido vacío (pGP564,) y la cepa WT transformada con el plásmido vacío.

Según los datos obtenidos en el microarreglo, ninguno de los genes contenidos en el plásmido #19 cambió su expresión ante un tratamiento con tunicamicina, por lo que el defecto observado en la cepa $\Delta hog1$ no parece ser debido a un defecto transcripcional de alguno de estos genes.

Para poder encontrar cual es el gen, o genes encargados de suprimir el fenotipo, se deben aislar las regiones codificantes para expresar por separado los genes que contiene el plásmido supresor.

Se comenzó este análisis con los genes *RER2* y *NTH2*. Este último codifica una proteína con un 77% de identidad con la trealasa neutra Nth1p; sin embargo, no parece presentar actividad enzimática (Nwaka *et al.* 1995). Se ha observado que juega algún papel en la tolerancia a un aumento en la temperatura, y se ha planteado la posibilidad de que participe también en la respuesta a otros tipos de

estrés mediante alguna función independiente a la hidrólisis de trealosa (Nwaka *et al.* 1995). Dadas estas características, se eligió como gen candidato supresor.

Se eligió también a *RER2*, que codifica para la cis-preniltransferasa que se localiza en el retículo endoplásmico y la cual participa en la síntesis de dolicol. Además, esta proteína juega un papel importante en la correcta localización de las proteínas del RE (Sato *et al.* 1999).

Se amplificaron y clonaron de forma independiente los genes *NTH2* y *RER2* en el vector pYES2, el cual permite inducir con galactosa la expresión del gen clonado en este. Se transformaron la cepa silvestre y la mutante nula $\Delta hog1$ con el plásmido pYES2 vacío y respectivamente con *NTH2* o *RER2* clonado en el mismo vector.

Como se puede observar en la figura 15, la sobreexpresión de la cis-preniltransferasa *RER2* fue capaz de suprimir el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$. Mientras, la cepa que sobreexpresó la trealasa *NTH2* mostró la misma sensibilidad a este antibiótico que la mutante nula que contiene sólo al plásmido vacío.

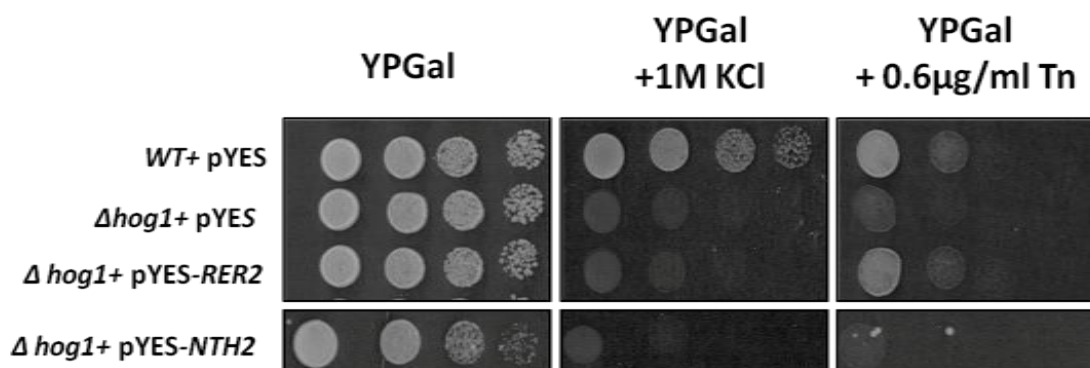


Figura 15. La sobreexpresión de Rer2p suprimió el fenotipo a sensibilidad a Tn de la cepa $\Delta hog1$. Ensayos por goteo para evaluar la sensibilidad a Tn (0.6 µg/ml) y a KCl (1 M) de la cepa $\Delta hog1$ transformada con el plásmido de expresión inducible por galactosa pYES vacío o respectivamente con el gen *RER2* o *NTH2* clonado.

Esto muestra que aunque se ha implicado a Nth2p en contener con algunos tipos de estrés como el aumento en la temperatura, su sobreexpresión no es capaz de aliviar el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la cepa *Δhog1*.

Se ha observado que Hog1p regula la síntesis de trealosa ante un aumento en la osmolaridad. Este disacárido aumenta su concentración ante diferentes tipos de estrés en donde funciona principalmente como estabilizador osmótico. Sin embargo, los datos obtenidos con este ensayo mostraron que no es el papel que juega Hog1p en la regulación de la trealosa lo que se requiere ante un tratamiento con tunicamicina, sino su participación en la regulación de la síntesis de lípidos; ya que es la sobreexpresión de *RER2*, primera enzima de la ruta de síntesis del dolicol (Fig.16), la que fue capaz de revertir por completo el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la cepa *Δhog1*.

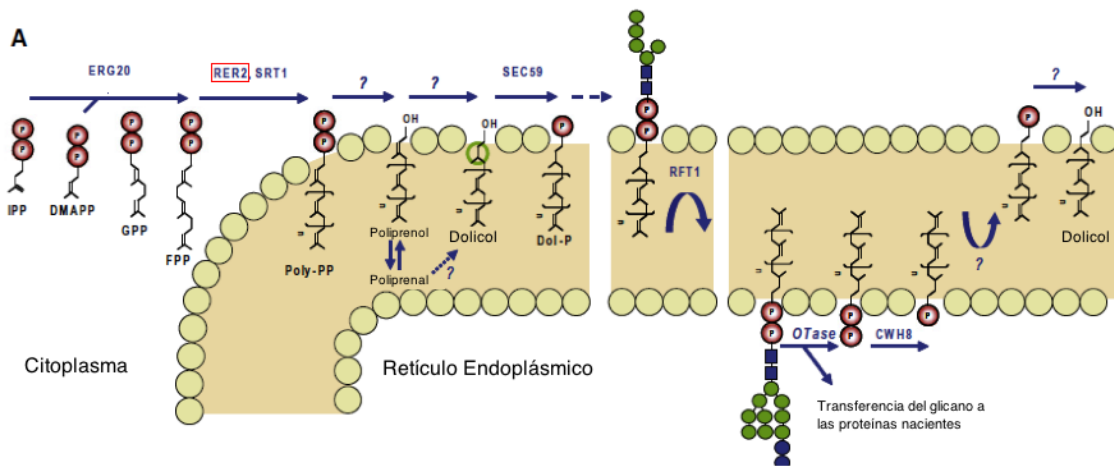


Figura 16. Síntesis y funciones del dolicol. El primer paso de la vía de síntesis del dolicol es llevado a cabo en el RE por la enzima Rer2p y en otras partículas lipídicas por SRT1. Esta molécula servirá como base para el armado de la estructura glicosídica que será transferida a las proteínas que requieren ser glicosiladas.

El dolicol forma parte de las membranas celulares y es la base lipídica sobre la cual se forman las estructuras glicosídicas que serán transferidas a las proteínas que requieren glicosilación (Fig.14). La tunicamicina inhibe a la enzima que comienza el armado de estas estructuras sobre el dolicol, y es posible que el fenotipo de la cepa *Δhog1*, más que deberse a defectos en la respuesta a proteínas mal plegadas, sea consecuencia de defectos en la síntesis de estos lípidos.

DISCUSIÓN

1. HOG1P NO SE FOSFORILA ANTE UN TRATAMIENTO CON TUNICAMICINA

En este trabajo se comprobó que aunque se requiere la presencia de Hog1p para responder a la tunicamicina no se requiere su fosforilación. Se analizaron muestras tratadas hasta por 180 minutos con tunicamicina y no se observó fosforilación de Hog1p ante este tratamiento. Esto comprueba y amplía los datos reportados anteriormente y muestra que ante un tratamiento con tunicamicina no es necesario que Hog1p esté fosforilado en la treonina 174 y en la tirosina 176.

El anticuerpo que se utiliza para detectar la fosforilación de Hog1p está dirigido contra la forma fosforilada de p38 y reconoce solamente la treonina 174 y la tirosina 176 cuando ambas están fosforiladas, por lo que con los datos obtenidos y los reportados hasta el momento no se puede descartar que esta cinasa se encuentre fosforilada en algún otro residuo.

También, puede ser que ésta cinasa participe en ciertos procesos celulares, como la respuesta a la tunicamicina, sin requerir ser fosforilada en la treonina 174 y en la

tirosina 176. Esto plantearía nuevas formas en las que puede actuar y ser regulada esta MAPK.

En la levadura *S. cerevisiae* no existen trabajos en los que se reporte que alguna de sus MAP cinasas pueda presentar actividad sin estar fosforilada en el motivo T-X-Y, y con los datos obtenidos hasta el momento, no es posible asegurar que ante un tratamiento con tunicamicina Hog1p se encuentre activo como cinasa; sin embargo, se ha observado que no sólo se requiere de su presencia, sino también de su dominio de cinasa intacto para permitir a la célula sobrevivir a este tipo de estrés. Por lo tanto sería interesante diseñar algún ensayo que permita observar la actividad de cinasa de Hog1p ante un tratamiento con tunicamicina.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio (Hernández-Elvira, M. datos sin publicar) señalan que para la respuesta a la tunicamicina se requiere únicamente del dominio de andamiaje de la MAPKK Pbs2p, y no se requiere de su actividad de cinasa. Esto podría estar señalando que efectivamente no es necesaria la fosforilación de Hog1p ante este tratamiento.

Los estudios sobre la regulación y actividad de esta MAP cinasa resultan atractivos ya que podrían ayudar a esclarecer detalles sobre los mecanismos de señalización celular que podrían llegar a extrapolarse a otros organismos, ya que Hog1p se encuentra altamente conservada entre especies.

2. ANÁLISIS MEDIANTE MICROARREGLOS DE LOS CAMBIOS OCASIONADOS POR LA TUNICAMICINA EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS

2.1.1 LA TUNICAMICINA CAUSA CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE ALGUNOS GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS DE LAS VÍAS DE MAP KINASAS

Al tratar a las células con tunicamicina, o con otro tratamiento que cause estrés de RE, se disparan cambios en el programa transcripcional que permiten a la célula contender con el estrés.

Trabajos anteriores han caracterizado los cambios que los inductores de estrés de RE ocasionan en la expresión génica (Kimata *et al.* 2006; Travers *et al.* 2000). Se ha observado que cambia el nivel de los transcritos de algunos genes que participan en procesos metabólicos, y más que nada se genera un ambiente en el cual puede aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas. Entre otras cosas, aumenta la expresión de genes que participan tanto en la síntesis de la membrana de RE, como de los que participan en el plegamiento y glicosilación de proteínas. Aumenta también la transcripción de genes que codifican para proteínas que participan en el transporte y la degradación de proteínas.

En este trabajo se muestra que además de los genes que causan un aumento en la capacidad de plegamiento de proteínas en el RE, un tratamiento con tunicamicina genera cambios en los niveles de transcritos de genes que codifican para proteínas que participan en las vías de MAP cinasas. Dentro de éstos, se puede observar que aumenta la expresión de varios de los genes que forman parte la vía de HOG. Esto concuerda con los fenotipos de sensibilidad que presentan las mutantes nulas de los genes que conforman esta vía ante un tratamiento con tunicamicina.

Estos datos sugieren que la tunicamicina no sólo genera cambios específicamente en el RE, sino que es capaz de regular procesos citoplásmicos. Dentro de estos, es claro que la célula necesita remodelar la expresión de otras vías de señalización además de la vía de UPR.

2.2 ANTE UN TRATAMIENTO CON TUNICAMICINA LA AUSENCIA DE HOG1P CAUSA UN DESBALANCE EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE ALGUNOS GENES

Se ha reportado ampliamente que ante un aumento en la osmolaridad, Hog1p se fosforila y se transporta al núcleo en donde participa de diversas formas en la regulación de la expresión génica (Warringer *et al.* 2010; Melamed *et al.* 2008). Estos cambios permiten a la célula montar una respuesta y adaptarse para sobrevivir a esta condición de estrés.

Se ha reportado que Hog1p participa en regular la expresión de un grupo de genes en respuesta a daños en la pared celular y al igual que como se observa ante un tratamiento con tunicamicina, no requiere transportarse al núcleo (Bermejo *et al.* 2008)

Esto nos muestra que Hog1p es capaz de generar cambios transcripcionales de dos formas distintas, una depende de su actividad en el núcleo, como es el caso de la respuesta al estrés osmótico, y otra puede ejercerla desde el citoplasma.

Esta hipótesis es apoyada por el trabajo de Westfall *et al.*(2008), en donde se mostró que una cepa en la que Hog1p se encuentra anclada a la membrana plasmática, es capaz de sobrevivir a un aumento en la osmolaridad, e incluso de generar algunos cambios transcripcionales. Sin embargo, se observa también que existe un grupo de genes que requieren estrictamente la actividad nuclear de Hog1p para poder aumentar su expresión.

Como se mencionó anteriormente, ante un tratamiento con tunicamicina se generan cambios en los niveles de transcritos de genes que codifican para proteínas que participan en las vías de MAP cinasas. Algunos de estos cambios no suceden o muestran un patrón diferente en ausencia de Hog1p.

Además se observaron algunos cambios en la vía de respuesta a feromona. Se ha reportado previamente que en ausencia de Hog1p puede existir cierta comunicación cruzada entre esta vía y la de HOG (O'Rourke & Herskowitz 1998).

Por lo que es posible que esta cinasa ejerza cierto control transcripcional sobre la vía de feromona para evitar esa comunicación cruzada.

También se observó que ante el tratamiento utilizado en este trabajo en ausencia de Hog1p los niveles de transcritos de algunos factores de transcripción asociados con vías de MAP cinasas muestran niveles diferentes a la cepa silvestre. Dentro de éstos, se encuentra Msn2p, uno de los factores de transcripción que participa en la respuesta general a estrés y que se ha reportado que puede ser regulado por Hog1p en respuesta al estrés osmótico (Melamed *et al.* 2008). También se observó a Rlm1p, factor de transcripción que es regulado por la vía de la PKC en respuesta a daños en la pared (Watanabe *et al.* 1995).

En la mutante nula de $\Delta hog1$, en las muestras tratadas con tunicamicina, es menos abundante el transcrito de *DOG2*. Este gen codifica para una proteína cuya expresión se induce por el estrés osmótico y el estrés oxidativo. Los sustratos naturales celulares de esta enzima no han sido identificados; sin embargo, su sobreexpresión confiere resistencia al inductor de estrés de RE 2-Desoxiglucosa (Randez-Gil 1995). También se pudo observar este mismo comportamiento en los niveles del gen *HSC82*, que codifica para una chaperona. Esta chaperona es importante pues participa en el plegamiento de proteínas y en la regulación de la señalización celular (Picard 2002; Yang *et al.* 2006). La disminución en los niveles de estos genes en ausencia de *HOG1* indica que esta cinasa es capaz de regular algunos aspectos de la respuesta general de estrés y es posible que parte del fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina observado en esta cepa se deba a estas deficiencias.

Los datos mostrados respecto a los factores de transcripción que pueden ser regulados por Hog1p en respuesta a la tunicamicina no son completamente concluyentes; sin embargo, existen evidencias bibliográficas y obtenidas con otros

datos de este trabajo que apuntan hacia una participación principalmente de Spt23p (y/o su parólogo Mga2p), debido a su papel en la regulación del metabolismo de lípidos (Chellappa *et al.* 2001) y en la regulación de genes que dependen para su expresión de la concentración de ergosterol y de la presencia de Hog1p (Hickman *et al.* 2011).

Es posible que además de los factores de transcripción sugeridos anteriormente, Hog1p esté influenciando la actividad de otros reguladores transcripcionales, ya sea de forma directa o a través de intermediarios. Para poder realizar aseveraciones más concluyentes sobre los reguladores transcripcionales que están involucrados en la respuesta a la tunicamicina que depende de Hog1p aún son necesarios otros tipos de análisis.

3. RER2 SUPRIME EL FENOTIPO DE SENSIBILIDAD A LA TUNICAMICINA DE LA CEPA Δ HOG1

Rer2p es una de las dos cis-prenil-transferasas que expresa *S. cerevisiae*. Esta enzima se localiza en el RE y participa en la síntesis de los poliprenoles precursores del dolicol. Esta proteína condensa el farnesildifosfato con unidades de isopentenildifosfato formando poliprenildifosfato (Figura 17).

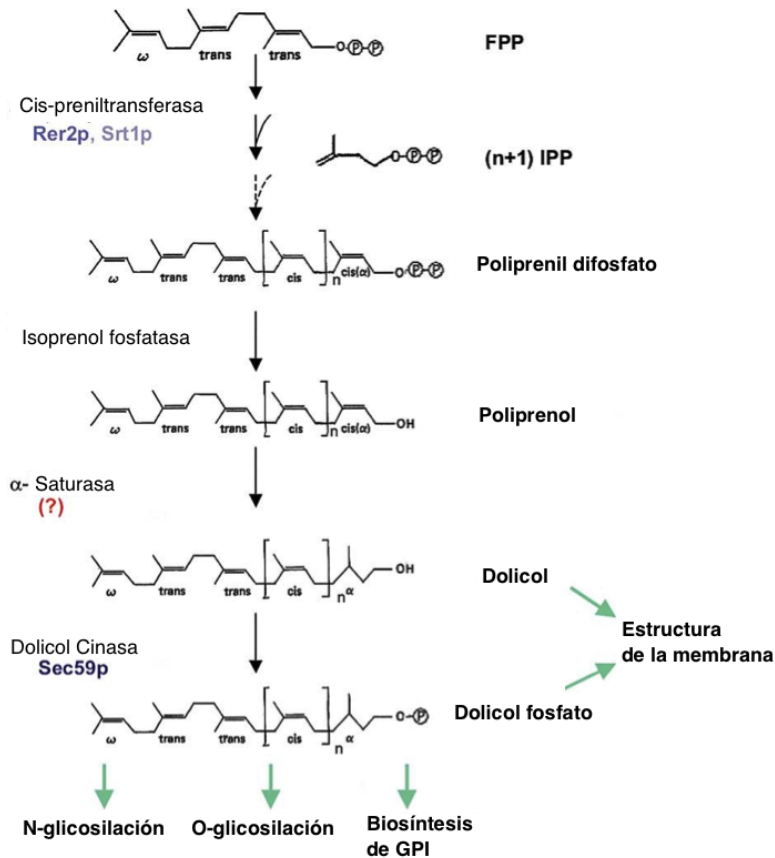


Figura 17. Vía de síntesis y procesos posteriores en los que participa el dolicol (Modificada de Grabińska & Palamarczyk 2002).

En la N-glicosilación el dolicol es la base sobre la que se forma la estructura glicosídica que posteriormente será transferida a los residuos de asparagina de las proteínas que requieren esta modificación. Además, el dolicol-fosfato-manosa es clave en la O-glicosilación, pues funciona como donador de la primera manosa que se une a los residuos de serina y treonina de las proteínas modificadas (Herscovics & Orlean 1993). Esta molécula participa también en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol y constituye un donador de manosa indispensable para la síntesis de la pared celular (Lesage & Bussey 2006).

En este trabajo se muestra que la sobreexpresión de Rer2p alivia el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la mutante nula $\Delta hog1$. Esto nos indica que una mutante nula de *HOG1* presenta defectos asociados ya sea con la síntesis del

dolicol o con alguna de las funciones posteriores en las que este participa. Se ha observado también que Rer2p participa de alguna manera en controlar el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi (Sato *et al.* 1999), por lo que existe la posibilidad de que Hog1p participe también en este proceso.

Se ha identificado que la sobreexpresión de Rer2p también es capaz de suprimir defectos de crecimiento de cepas deficientes en genes que participan en diferentes pasos de la glicosilación. Algunas de estas cepas presentan defectos en la pared celular, por lo que muestran sensibilidad al calcoflúor, compuesto que se une a la celulosa y a la quitina; además algunas de estas cepas son incapaces de crecer a 37°C .

Se ha reportado que Rer2p es capaz de aliviar el fenotipo de sensibilidad al calcoflúor de la mutante nula $\Delta sec59$ (cinasa de dolicol) y $\Delta dpm1$ (enzima que cataliza la transferencia de manosa al dolicol fosfato) (Orlowski *et al.* 2007). También se ha reportado que es capaz de suprimir los defectos de crecimiento a altas temperaturas y el aumento en la expresión de *FUS1* de mutantes de los genes *PMI40*, *OCH* y *DPM1* (Cullen *et al.* 2000). En este trabajo se observó que un tratamiento con tunicamicina ocasionó un aumento en la expresión de este gen; sin embargo, el aumento es mucho mayor en las mutantes defectuosas en la glicosilación. Adicionalmente Fus1p es una proteína que se induce en respuesta a feromona y que participa en la degradación de la pared celular para facilita la fusión celular (Nolan *et al.* 2006), por lo que es posible que los defectos ocasionados en la pared debido a defectos en la glicosilación sean lo que dispara el aumento en su expresión.

Al igual que las mutantes reportadas en el trabajo de Cullen *et al.* (2000), la cepa $\Delta hog1$ presenta también un aumento en la expresión de *FUS1* ante un tratamiento con tunicamicina. Anteriormente se observó que en una mutante nula $\Delta hog1$

aumenta la expresión de este gen ante un tratamiento con estrés osmótico, por lo que se ha postulado que este efecto sucede como consecuencia de una comunicación cruzada entre la vía de estrés osmótico y la de feromona que puede suceder sólo en ausencia de *HOG1* (Nelson *et al.* 2004; O'Rourke & Herskowitz 1998). Sin embargo, es posible también que los defectos que se ocasionen en la glicosilación, y en consecuencia en la pared celular, en ausencia de esta cinasa participen también en este aumento en la expresión de *FUS1*.

El hecho de que la sobreexpresión de *RER2* sea capaz de suprimir el defecto de crecimiento en tunicamicina de la cepa $\Delta hog1$, aunado a los datos del microarreglo obtenidos en este trabajo, en los que observa tanto el aumento de la expresión de *FUS1*, como cambios en la expresión de genes involucrados en la mannosilación, sugieren que la mutante nula de esta cinasa presenta defectos en los procesos de glicosilación.

Al inhibir con tunicamicina a Alg7p, enzima que transfiere N-acetil glucosamina-1-fosfato al dolicol fosfato, es posible que se evite el flujo del dolicol-fosfato. Si la cepa $\Delta hog1$ es deficiente en la síntesis de este lípido, al sufrir un tratamiento con este antibiótico es incapaz de generar nuevas posas que le permitan contender no sólo con la disminución de N-glicosilación, sino con los defectos que la disminución en la concentración de este lípido ocasionan en diversos procesos celulares.

Este efecto ha sido observado en la cepa deficiente de Cax4p (Cw8p), fosfatasa del dolicol pirofosfato que permite el reciclaje del dolicol y cuyo fenotipo deficiente en la producción de N-glicanos es rescatado por la sobreexpresión de *RER2* (van Berkel *et al.* 1999; Fernández *et al.* 2001) .

Se ha reportado que la actividad de Hog1p es regulada tanto por la turgencia de la membrana plasmática, como por cambios en la fluidez de ésta. Respecto a estos

cambios, se ha observado que Hog1p puede ser activada dependiendo de la concentración de esfingolípidos y ergosterol de la membrana plasmática (Tanigawa *et al.* 2012; Hickman *et al.* 2011). A su vez, esta cinasa regula, en respuesta al estrés osmótico, la expresión de algunos de los genes que participan en la síntesis del ergosterol (Montañés *et al.* 2011). En este trabajo se observó también que ante un tratamiento con tunicamicina existen cambios, dependientes de Hog1p, en la expresión de genes que participan en la ruta del mevalonato (*ERG12*) y en la síntesis del ergosterol. La ruta del mevalonato es la que alimenta tanto a la vía de síntesis del dolicol como a la del ergosterol (Fig.18). Y ya que se ha observado que Hog1p es capaz de regular la síntesis de ergosterol, es también muy posible que pueda regular otras ramas de la vía del mevalonato, como la de síntesis del dolicol.

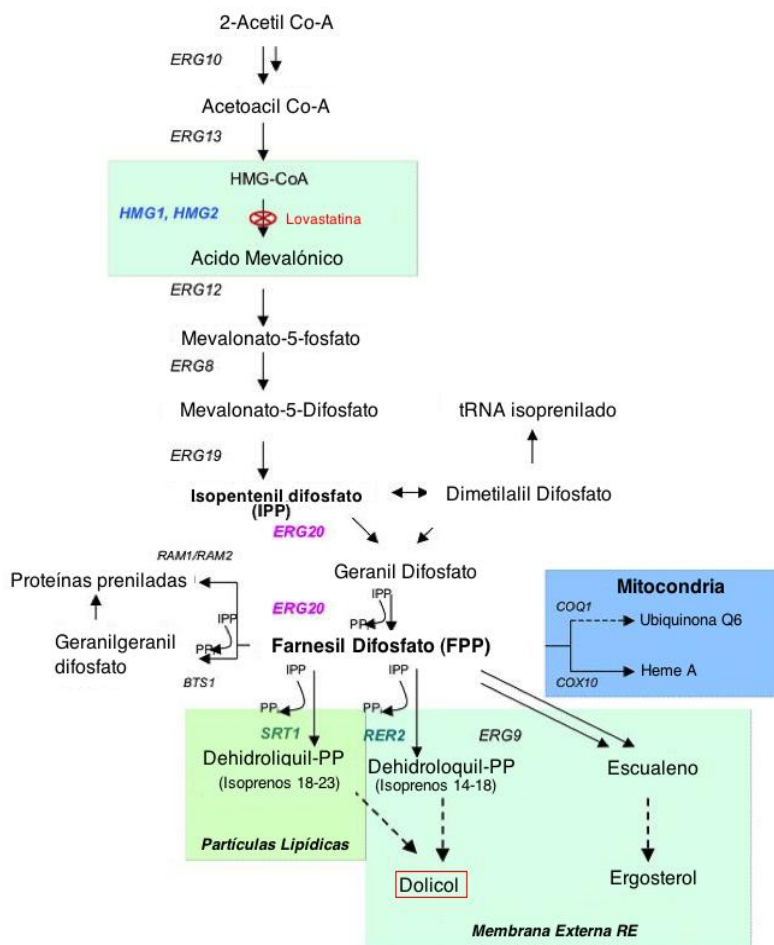


Figura 18. Vía del Mevalonato y las ramas de síntesis de otros lípidos a partir del Farnesildifosfato (Modificada de Grabińska & Palamarczyk 2002).

Por otro lado, se observó también que la sobreexpresión de *RER2* no fue capaz de aliviar el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina de la mutante nula de *Hac1p*, factor de transcripción de la vía de UPR, el cual está implicado en montar la respuesta al aumento en proteínas mal plegadas en el RE. Esta observación coincide con los datos mostrados por Torres-Quiroz *et al.* (2010), en los que se observa que *Hog1p* no participa de forma alguna ni en la vía de señalización de la UPR (*Ire1p-Hac1p*), ni en la respuesta transcripcional mediada por esta; ya que en ausencia de esta cinasa no existen cambios ni en el procesamiento de *Hac1p*, ni en la expresión de un gen reportero controlado por los sitios de respuesta a estrés de RE. Estos datos señalan que la vía de UPR participa en contender algunos de los efectos que ocasiona la tunicamicina, mientras que *Hog1p* participa en otros. Específicamente, la vía de UPR ayuda a aliviar los efectos de este antibiótico sobre el plegamiento y degradación de proteínas, mientras que *Hog1p* participa en procesos asociados con la síntesis del dolicol.

Finalmente es importante mencionar que una mutante $\Delta rer2$, presenta un aumento en la producción de escualeno, uno de los intermediarios en la síntesis del ergosterol (Sato *et al.* 1999). Junto con esto, cabe señalar que una mutante nula de *Hog1p* presenta un aumento en la síntesis del ergosterol (Montañés *et al.* 2011).

Estos datos, junto con las observaciones reportadas en este trabajo, muestran el papel que juegan los lípidos no sólo para contender con el estrés, sino también en la señalización celular, pues sugieren que el fenotipo observado en una mutante nula $\Delta hog1$ ante un tratamiento con tunicamicina posiblemente se debe a defectos en la regulación de la síntesis de lípidos que dependen de la ruta del mevalonato.

Para comprobar esta hipótesis se requeriría evaluar el contenido de estos lípidos ante un tratamiento con tunicamicina. Además, se podría evaluar el fenotipo de una cepa *Δhog1* en presencia de inhibidores de la vía del mevalonato y de sus ramas.

CONCLUSIONES

No es necesario que Hog1p se fosforile para contender con un tratamiento con tunicamicina.

Ante un estrés producido por tunicamicina, la ausencia de Hog1p ocasiona un desbalance en la expresión de un grupo extenso de genes que participan en procesos celulares diversos, como la fosforilación oxidativa, la señalización y la síntesis de proteínas.

La sobreexpresión de la cis-prenil-transferasa Rer2p en una mutante nula *Δhog1* es capaz de aliviar el fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina.

Proponemos que Hog1p participa en la síntesis del dolicol, y es debido a esto que se requiere para contender con un tratamiento con tunicamicina.

BIBLIOGRAFÍA

Van Berkel, M. a *et al.*, 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* CWH8 gene is required for full levels of dolichol-linked oligosaccharides in the endoplasmic reticulum and for efficient N-glycosylation. *Glycobiology*, 9(3), pp.243–53.

Bermejo, C. *et al.*, 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular biology of the cell*, 19(3), pp.1113–24.

Bicknell, A. a, Tourtellotte, J. & Niwa, M., 2010. Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), pp.17545–55.

Biondi, R.M. & Nebreda, A.R., 2003. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *The Biochemical journal*, 372(Pt 1), pp.1–13.

Brown, J.L., Bussey, H. & Stewart, R.C., 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *The EMBO journal*, 13(21), pp.5186–94.

Caffrey, D.R., O'Neill, L. a & Shields, D.C., 1999. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *Journal of molecular evolution*, 49(5), pp.567–82.

Chellappa, R. *et al.*, 2001. The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene expression. Fatty acid-mediated regulation of Mga2p activity is independent of its proteolytic processing into a soluble transcription act. *The Journal of biological chemistry*, 276(47), pp.43548–56.

Cullen, P.J. *et al.*, 2000. Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics*, 155(3), pp.1005–18.

Dolan, J.W., Kirkman, C. & Fields, S., 1989. The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), pp.5703–7.

- Edmunds, J.W. & Mahadevan, L.C., 2004. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of cell science*, 117(Pt 17), pp.3715–23.
- Escoté, X. *et al.*, 2004. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature cell biology*, 6(10), pp.997–1002.
- Fassler, J.S. & West, A.H., 2010. Genetic and Biochemical Analysis of the SLN1 Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 471(10), pp.291–317.
- Fernandez, F. *et al.*, 2001. The CWH8 gene encodes a dolichyl pyrophosphate phosphatase with a lumenally oriented active site in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 276(44), pp.41455–64.
- Gadal, O. *et al.*, 2002. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *The EMBO journal*, 21(20), pp.5498–507.
- García, R. *et al.*, 2009. The High Osmotic Response and Cell Wall Integrity Pathways Cooperate to Regulate Transcriptional Responses to Zymolyase-induced Cell Wall Stress in *Saccharomyces cerevisiae**S. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp.10901–10911.
- García-Rodríguez, L.J., Durán, a & Roncero, C., 2000. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *Journal of bacteriology*, 182(9), pp.2428–37.
- Grabińska, K. & Palamarczyk, G., 2002. Dolichol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an insight into the regulatory role of farnesyl diphosphate synthase. *FEMS yeast research*, 2(3), pp.259–65.
- Han, J. *et al.*, 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5173), pp.808–11.
- He, X.-J., Mulford, K.E. & Fassler, J.S., 2009. Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryotic cell*, 8(5), pp.768–78.
- Herscovics, A. & Orlean, P., 1993. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(6), pp.540–50.

- Hickman, M.J., Spatt, D. & Winston, F., 2011. The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 188(2), pp.325–38.
- Kaeberlein, M. *et al.*, 2002. High Osmolarity Extends Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* by a Mechanism Related to Calorie Restriction. *Molecular and cellular biology*, 22(22), pp.8056–8066.
- Kimata, Y. *et al.*, 2006. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes to Cells*, 11(1), pp.59–69.
- Krantz, M., Becit, E. & Hohmann, S., 2006. Comparative analysis of HOG pathway proteins to generate hypotheses for functional analysis. *Current genetics*, 49(3), pp.152–65.
- Lesage, G. & Bussey, H., 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(2), pp.317–43.
- Li, S. *et al.*, 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *The EMBO journal*, 17(23), pp.6952–62.
- Maeda, T., Takekawa, M. & Saito, H., 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), pp.554–8.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H., 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), pp.242–5.
- Mas, G. *et al.*, 2009. Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *The EMBO journal*, 28(4), pp.326–36. A
- Melamed, D., Pnueli, L. & Arava, Y., 2008. Yeast translational response to high salinity : Global analysis reveals regulation at multiple levels Yeast translational response to high salinity : Global analysis reveals regulation at multiple levels. , pp.1337–1351.
- Montañés, F.M., Pascual-Ahuir, A. & Proft, M., 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Molecular microbiology*, 79(4), pp.1008–23.

- Morse, R.H., 2000. RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends in genetics : TIG*, 16(2), pp.51–3.
- De Nadal, E., Alepuz, P.M. & Posas, F., 2002. Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO reports*, 3(8), pp.735–40.
- Nelson, B. *et al.*, 2004. Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics*, 166(1), pp.67–77.
- Nolan, S. *et al.*, 2006. FUS1 regulates the opening and expansion of fusion pores between mating yeast. *Molecular biology of the cell*, 17(5), pp.2439–50.
- Nwaka, S., Kopp, M. & Holzer, H., 1995. Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 270(17), pp.10193–8.
- O'Rourke, S.M. & Herskowitz, I., 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 12(18), pp.2874–86.
- O'Rourke, S.M.O. & Herskowitz, I., 2004. Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(February), pp.532–542.
- Oikawa, D., Kimata, Y. & Kohno, K., 2007. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *Journal of cell science*, 120(Pt 9), pp.1681–8.
- Orlowski, J. *et al.*, 2007. Dissecting the role of dolichol in cell wall assembly in the yeast mutants impaired in early glycosylation reactions. *Yeast*, 24, pp.239–252.
- Ota, I.M. & Varshavsky, a, 1992. A gene encoding a putative tyrosine phosphatase suppresses lethality of an N-end rule-dependent mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), pp.2355–9.
- Ota, I.M. & Varshavsky, A., 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5133), pp.566–9.

- Picard, D., 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(10), pp.1640–8.
- Posas, F. *et al.*, 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), pp.17249–55.
- Posas, F., Witten, E.A. & Saito, H., 1998. Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 18(10), pp.5788–96.
- Proft, M. & Struhl, K., 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular cell*, 9(6), pp.1307–17.
- Proft, M. & Struhl, K., 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3), pp.351–61.
- Qi, M. & Elion, E.A., 2005. MAP kinase pathways. *Journal of cell science*, 118(Pt 16), pp.3569–72.
- Raitt, D.C., Posas, F. & Saito, H., 2000. Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO journal*, 19(17), pp.4623–31.
- Randez-Gil, F. *et al.*, 1995. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast (Chichester, England)*, 11(13), pp.1233–40.
- Rep, M. *et al.*, 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 3, pp.715–27.
- Ron, D. & Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Cell. Biol*, 8, pp.519–529.
- Sato, M. *et al.*, 1999. The Yeast RER2 Gene , Identified by Endoplasmic Reticulum Protein Localization Mutations , Encodes cis -Prenyltransferase , a Key Enzyme in Dolichol Synthesis. *Molecular and cellular biology*, 19(1), pp.471–483.

- Sidrauski, C. & Walter, P., 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), pp.1031–1039.
- Tanigawa, M. *et al.*, 2012. Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 32(14), pp.2861–70.
- Tatebayashi, K. *et al.*, 2007. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO journal*, 26(15), pp.3521–33.
- Thorsen, M. *et al.*, 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Molecular biology of the cell*, 17(10), pp.4400–10.
- Todd-Corlett, A. *et al.*, 2007. Lobe IB of the ATPase domain of Kar2p/BiP interacts with Ire1p to negatively regulate the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, 367(3), pp.770–87.
- Torres-Quiroz, F. *et al.*, 2010. The activity of the yeast HOG1 MAP kinase is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *The Journal of biological chemistry*. Jun 25;285(26):20088-96
- Travers, K.J. *et al.*, 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101(3), pp.249–58.
- Ward, M.P. *et al.*, 1995. SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Molecular and cellular biology*, 15(12), pp.6854–63.
- Warringer, J. *et al.*, 2010. The HOG Pathway Dictates the Short-Term Translational Response after Hyperosmotic Shock. *Mol. Biol. Cell*, 21(September 1), pp.3080–3092.
- Watanabe, Y., Irie, K. & Matsumoto, K., 1995. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 15(10), pp.5740–9.
- Westfall, P.J. *et al.*, 2008. Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), pp.12212–7.

- Winkler, A. *et al.*, 2002. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell*, 1(2), pp.163–73.
- Xu, E.Y. *et al.*, 1999. Identification of SAS4 and SAS5, two genes that regulate silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 153(1), pp.13–23.
- Yang, X.-X. *et al.*, 2006. The molecular chaperone Hsp90 is required for high osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 6(2), pp.195–204.